



Université de la Méditerranée
Centre d'Océanologie de Marseille
Ecole doctorale Science de l'Environnement



N° d'ordre de la thèse

Thèse

Présentée par
NATHALIE ZABETI

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de la Méditerranée
Spécialité: Océanographie – Biologie et écologie marine

Etude de l'effet des processus diagénétiques sur les alcénones: Impact sur les estimations de paléotempératures

Soutenue le 8 septembre 2010 devant la commission d'examen:

Dr. DERENNE, S.	Directeur de recherche- CNRS- Paris	Rapporteur
Pr. SALIOT, A.	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Pr. MICHOTEY, V.	Professeur- Université de la Méditerranée	Examineur
Dr. VOLKMAN, J.K.	Research Program leader- CSIRO - Australia	Examineur
Dr. BONIN, P.	Directeur de recherche –CNRS- Marseille	Co-directeur de thèse
Dr. RONTANI, J.-F.	Chargé de recherche – CNRS- Marseille	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie marine (LMGEM) du centre d'océanologie de Marseille. Je remercie vivement le Dr. Richard Sempéré et le Pr. Ivan Dekeyser pour m'avoir accueillie dans leur établissement.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Dr. Sylvie Derrenne et au Pr. Alain Saliot pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit ainsi que pour les précieuses remarques qu'ils ont pu y apporter. Je remercie également sincèrement le Pr. Valérie Michotey, le Dr. John Volkman ainsi que les Drs Jean-François Rontani et Patricia Bonin pour leur participation à ce jury de thèse.

Parce que ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans l'aide de collaborateurs extérieurs, je tiens à remercier les Drs John Volkman, Stuart Wakeham et Fred Prahl, pour nous avoir fourni les échantillons nécessaires à cette étude et de manière générale pour leur contribution précieuse le long de ce travail.

Pour m'avoir appris les bases de la biologie moléculaire ainsi que pour m'avoir aidé dans mon travail, je remercie Mme Sophie Guasco.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du 2^{ème} étage ainsi que tout ceux qui ont partagé mes journées au sein du laboratoire : Danielle, Monique, Philippe, Cécile, Valérie, Patricia, Cédric, Dany, Aude ... et à ceux que j'oublie, tous ont su faire preuve d'une grande disponibilité, de soutien et d'un accueil chaleureux.

Merci à Dany pour avoir pris le temps de lire mon introduction bibliographique.

Un merci particulier au Prs Philippe Cuny et Cécile Militon, avec qui j'ai encadré les travaux pratiques de microbiologie, pour tous les bons moments passés, leurs sourires et pour leur grande gentillesse.

J'adresse toutes mes amitiés aux thésards et stagiaires qui ont croisé ma route durant ces trois années et je leur adresse mes sincères remerciements pour les fous-rires, les moments partagés et les encouragements qu'ils savent prodiguer mieux que personne. Une dédicace spéciale à Cédric pour m'avoir guidé dans le laboratoire à mon arrivée.

Cette thèse a été conduite sous la direction du Dr. Jean-François Rontani et du Dr. Patricia Bonin. J'ai conscience d'avoir eu beaucoup de chance de travailler sous leur tutelle durant cette thèse et je leur adresse aujourd'hui mes remerciements les plus profonds :

Parce qu'elle a toujours su apporter un regard neuf et constructif sur mon travail, pour le précieux temps qu'elle a su me consacrer malgré un emploi du temps chargé, pour son écoute et sa gentillesse, je remercie chaleureusement le Dr. Patricia Bonin.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude au Dr. Jean-François Rontani. Pour tout ce qu'il a su m'apporter, humainement et scientifiquement tout au long de ces trois années, du fond du cœur, merci. L'enrichissement obtenu au contact de son travail, de sa passion et de son efficacité scientifique n'a pas de prix. Merci pour le temps consacré et la patience dont il a parfois dû faire preuve pour me communiquer son savoir. Je le remercie également de

m'avoir écoutée et soutenue dans ces moments de doutes et d'espoir.

Pour finir, je tiens à remercier tout ceux qui sont cachés dans l'ombre mais qui m'ont été d'un grand soutien durant cette thèse :

Ma famille qui m'a toujours soutenue dans mes choix et m'a poussé à me surpasser en toutes circonstances. Merci à Raphaël mon frère, Christine ma mère et un merci tout particulier à Fatholah mon père à qui je dois tant. Parce qu'il a toujours cru en moi et que ses encouragements ont su me porter jusqu'à ce jour.

Mes meilleures amies, Anne, Elodie et Angélique, pour ne s'être jamais lassé de m'entendre parler de mes doutes, de mes interrogations et de mon travail.

Enfin le plus grand des merci à l'homme que j'aime, Ceydric. Pour avoir partagé cette aventure de plus à mes côtés et pour avoir su me supporter et me motiver lors de mes journées de doutes.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	23
CHAPITRE I: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	29
1. LES PALEOMARQUEURS	31
1.1. LA COMPOSITION FAUNISTIQUE	32
1.2. LES ISOTOPES DE L' OXYGENE PRESERVES DANS LES FORAMINIFERES	32
1.3. LES LIMITES DES PALEOMARQUEURS : COMPOSITION FAUNISTIQUE ET ISOTOPES DE L' OXYGENE	33
1.4. LES BIOMARQUEURS MOLECULAIRES	34
1.4.1. L' $U_{37}^{K'}$	34
1.4.2. Le TEX_{86}	35
1.4.3. Les HBI	36
2. LES ALCENONES	38
2.1. LA DECOUVERTE DES ALCENONES.....	38
2.2. L'ORIGINE DES ALCENONES	39
2.2.1. L'origine des alcénones actuelles	39
2.2.2. L'origine des alcénones à travers les temps géologiques.....	42
2.3. LA STRUCTURE DES ALCENONES	43
2.3.1. La structure carbonée des alcénones	43
2.3.2. La biosynthèse des alcénones	45
2.4. LEUR ROLE.....	50
2.5. LES DIFFERENTES METHODES ANALYTIQUES UTILISEES POUR QUANTIFIER LES ALCENONES DANS DES ECHANTILLONS NATURELS	52
2.5.1. Analyses en chromatographie en phase gazeuse détection en ionisation de flamme (CPG-FID)	52
2.5.2. Analyses en chromatographie en phase gazeuse détection en ionisation de flamme (CPG-FID) bidimensionnelle	53
2.5.3. Analyses à l'aide d'un couplage chromatographie en phase gazeuse - spectromètre de masse travaillant en impact électronique (CPG-SMEI).....	53
2.5.4. Analyses à l'aide d'un couplage chromatographie en phase gazeuse-spectromètre de masse travaillant en ionisation chimique positive (CPG-SMICP).....	54
2.5.5. Analyses par CPG-SMEI après réduction et silylation	54
2.5.6. Analyses en Fast CPG-SM en temps de vol.....	56
3. LES ALCENONES, UN OUTIL PALEOCLIMATIQUE	57
3.1. LES ALCENONES, PALEOMARQUEURS DES TEMPERATURES DES EAUX DE SURFACE	57
3.2. LES DIFFERENTES CALIBRATIONS	59
3.2.1. Les différentes approches de calibrations	59
3.2.2. Quelles calibrations pour les hautes et basses latitudes ?.....	63
3.2.3. Une calibration valable à l'échelle des temps géologiques ?	64
3.3. LES AUTRES UTILISATIONS DES ALCENONES	65
3.3.1. La pression partielle en CO_2	65
3.3.2. La salinité	66
3.3.2.1. La composition isotopique en hydrogène	66
3.3.2.2. Le pourcentage en alcénones C_{37} tétra-insaturées.....	67
3.4. LES DIFFERENTES ETUDES MENEES.....	67
4. LES ALCENONES, UN BON PALEOMARQUEUR ?	71
4.1. LES ATOUTS DE CE PALEOMARQUEUR	71
4.1.1. La stabilité de l'indice $U_{37}^{K'}$ face aux variables environnementales autres que la température	71
4.1.2. La facilité d'analyse et de conservation des alcénones	71
4.1.3. La précision des mesures de l' $U_{37}^{K'}$	71
4.1.4. L'utilisation de l' $U_{37}^{K'}$ à larges échelles de temps et d'espace	72
4.1.5. La résistance des alcénones aux processus de dégradation	73
4.1.5.1. La résistance au broutage par le zooplancton.....	73
4.1.5.2. La résistance à la dégradation bactérienne.....	73
4.2. LES LIMITES DE CE PALEOMARQUEUR	74
4.2.1. Les incohérences observées entre les températures calculées à partir des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les températures actuelles mesurées à la surface des eaux	74

4.2.2. Les incohérences lors des études de températures passées	77
4.2.3. Les causes potentielles de ces incohérences	77
4.2.3.1. Les incohérences liées à la qualité de l'analyse	77
4.2.3.2. Les incohérences liées à une variabilité spatiale et/ou temporelle dans l'apport d'alcénones.....	79
4.2.3.2.1. L'apport d'alcénones allochtones par transport horizontal et vertical	79
4.2.3.2.2. Variation saisonnière du taux de dégradation des alcénones	80
4.2.3.3. Les incohérences liées à des phénomènes environnementaux, autres que la température.....	80
4.2.3.3.1. Le taux de croissance du phytoplancton.....	80
4.2.3.3.2. Disponibilité en nutriments et limitation de lumière	81
4.2.3.4. Les incohérences liées à une variabilité spatiale et/ou temporelle de la synthèse des alcénones	82
4.2.3.4.1. La profondeur de croissance des haptophytes	82
4.2.3.4.2. La saison de croissance des haptophytes	83
4.2.3.5. Les incohérences liées à une mauvaise calibration (variations inter et intra-spécifiques).....	85
4.2.3.5.1. Une mauvaise calibration liée à une variabilité dans les espèces dominantes productrices d'alcénones en fonction des zones géographiques.....	85
4.2.3.5.2. Une mauvaise calibration liée à une variabilité dans les espèces dominantes productrices d'alcénones au cours des temps géologiques.....	88
5. LA DEGRADATION DES ALCENONES.....	89
5.1. LES OBSERVATIONS D'UNE DEGRADATION SELECTIVE DES ALCENONES EXPOSEES A L'OXYGENE.....	90
5.2. LES PROCESSUS DE DEGRADATION ABIOTIQUE DES ALCENONES.....	91
5.2.1. Les processus de photo-oxydation.....	91
5.2.1.1. Définition.....	91
5.2.1.2. La dégradation des alcénones par photo-oxydation	95
5.2.2. Les processus d'autoxydation.....	96
5.2.2.1. Définition.....	96
5.2.2.2. La dégradation des alcénones par autoxydation.....	97
5.2.2.3. Des traceurs de l'autoxydation.....	99
5.3. LES PROCESSUS DE DEGRADATION BIOTIQUE DES ALCENONES.....	101
5.3.1. La dégradation biotique sélective	101
5.3.2. Les différentes voies métaboliques de dégradation des alcénones.....	102
5.3.3. Les traceurs de la dégradation bactérienne sélective des alcénones.....	105
5.4. LES PROCESSUS DE STEREOMUTATION	108
5.4.1. Formation des radicaux thiyles	109
5.4.2. La stéréomutation des alcénones	110
5.4.3. Induction des processus de stéréomutation en milieu naturel	111
5.4.4. Mise en évidence des processus de stéréomutation en milieu naturel.....	112
6. LA DEGRADATION DES ALCENONES EN MILIEU NATUREL : ETUDE DE CAS (RONTANI & WAKEHAM, 2008)	113
6.1. LA STEREOMUTATION EN MILIEU NATUREL.....	114
6.2. LA DEGRADATION BACTERIENNE EN MILIEU NATUREL.....	114
6.3. LA DEGRADATION ABIOTIQUE DES ALCENONES EN MILIEU NATUREL	117
 CHAPITRE II: ALTERATION POTENTIELLE DU PALEOTHERMOMETRE $U_{37}^{K'}$ DUE A UNE DEGRADATION SELECTIVE DES ALCENONES PAR DES BACTERIES MARINES ISOLEES A PARTIR DE L'HAPTOPHYTE <i>EMILIANA HUXLEYI</i>.....	119
1. INTRODUCTION.....	124
2. MATERIAL AND METHODS.....	126
3.1. FREEZE-DRIED CELLS OF E. HUXLEYI STRAIN CS-57.....	126
3.2. PURIFIED C ₃₇ ALKENONES	126
3.3. BACTERIAL ISOLATION AND GROWTH MEDIA	127
3.4. DNA EXTRACTION, PCR AND DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (DGGE) ANALYSIS	127
3.5. SEQUENCING AND COMPARATIVE ANALYSIS OF 16S rRNA PARTIAL SEQUENCES OF THE ISOLATES	128
3.6. LIPID EXTRACTION	129
3.7. ALKALINE HYDROLYSIS	129
3.8. ALKENONE REDUCTION.....	129
3.9. HYDROGENATION	129
3.10. DERIVATIZATION	130
3.11. GAS CHROMATOGRAPHY-ELECTRON IMPACT MASS SPECTROMETRY (GC-EIMS) ANALYSES.....	130

3. RESULTS AND DISCUSSION.....	130
3.1. BACTERIAL ISOLATION AND DGGE ANALYSIS.....	130
3.2. DEGRADATION OF ALKENONES BY THE DIFFERENT STRAINS ISOLATED.....	133
3.3. BIOGEOCHEMICAL IMPLICATIONS.....	140
4. CONCLUSIONS.....	141

CHAPITRE III: COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE SOUCHES BACTERIENNES ASSOCIEES A L'HAPTOPHYTE EMILIANA HUXLEYI.....143

1. INTRODUCTION.....	149
2. MATERIAL AND METHODS.....	150
2.1. BACTERIAL GROWTH MEDIUM.....	150
2.2. TREATMENT OF BACTERIAL CULTURES.....	150
2.3. ALKALINE HYDROLYSIS.....	150
2.4. Silylation.....	150
2.5. METHYLATION.....	151
2.6. ACIDIC HYDROLYSIS.....	151
2.7. HYDROGENATION.....	151
2.8. FORMATION OF PYRROLIDIDE DERIVATIVES TO DETERMINE DOUBLE BOND POSITIONS.....	151
2.9. GAS CHROMATOGRAPHY-ELECTRON IMPACT MASS SPECTROMETRY (GC-EIMS) ANALYSES.....	152
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	152
4. CONCLUSIONS.....	164

CHAPITRE IV: DEVENIR DES LIPIDES DANS LE MATERIEL PARTICULAIRE EN SUSPENSION DU NORD-OUEST DE LA MER MEDITERRANEE : DEGRADATION BIOTIQUE ET ABIOTIQUE DES STEROLS ET DES ALKENONES.167

1. INTRODUCTION.....	172
2. MATERIAL AND METHODS.....	173
2.1. COLLECTION OF THE SAMPLES.....	173
2.2. CHEMICAL TREATMENTS.....	174
2.2.1. Lipid extraction.....	174
2.2.2. NaBH ₄ reduction.....	174
2.2.3. Alkaline hydrolysis.....	174
2.2.4. Derivatisation.....	175
2.2.5. Identification and quantification of sterols and alkenones and their degradation products by Gas Chromatography - Electron Impact Mass Spectrometry (GC-EIMS).....	175
2.2.6. Standard degradation products.....	175
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	176
3.1. Δ^5 -STEROL DISTRIBUTIONS AND STEROL DEGRADATION.....	176
3.2. ALKENONE DEGRADATION IN THE NW MEDITERRANEAN.....	184
4. CONCLUSIONS.....	190

CHAPITRE V: VALIDITE DES TEMPERATURES MESUREES A PARTIR DU PALEOTHERMOMETRE $U_{37}^{K'}$ A LA SURFACE DES SEDIMENTS DANS LES HAUTES LATITUDES ET AUTRES ZONES OCEANOGRAPHIQUES..... 193

1. INTRODUCTION.....	198
2. MATERIAL AND METHODS.....	199
2.1. DESCRIPTION OF STUDY AREA.....	199
2.2. SURFACE SEDIMENT SAMPLES.....	201

2.3. BIODEGRADATION EXPERIMENTS	201
2.4. ANALYSIS OF ALCÉNONES	203
2.5. ANALYSIS OF EPOXYKETONES	203
3. RESULTS.....	204
3.1. ALKENONE CONTENT	205
3.2. ALKENONE COMPOSITION	207
3.3. EPOXIDE COMPOSITION	207
4. DISCUSSION.....	210
4.1. DIAGENETIC BIAS	210
4.2. IMPACTS OF SEASONALITY	212
4.3. OTHER CONSPICUOUS BIOGEOGRAPHIC PATTERNS IN MODEL "RESIDUALS"	215
5. CONCLUSIONS.....	219

CHAPITRE VI: LA DEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE PARTICULAIRE DANS L'OCEAN PACIFIQUE EQUATORIAL: BIOTIQUE OU ABIOTIQUE ?221

1. INTRODUCTION.....	226
2. MATERIEL AND METHODS.....	228
2.1. COLLECTION OF THE SAMPLES	228
2.2. LIPID EXTRACTION	229
2.3. NABH ₄ REDUCTION	229
2.4. ALKALINE HYDROLYSIS	229
2.5. DERIVATIZATION	230
2.6. GAS CHROMATOGRAPHY - ELECTRON IMPACT MASS SPECTROMETRY (GC-EIMS)	230
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	231
3.1. CASE 1: CHLOROPHYLL.....	232
3.2. CASE 2: MONOUNSATURATED FATTY ACIDS	235
3.3. CASE 3: Δ ⁵ -STENOLS	240
3.4. CASE 4: ALKENONES AND ALTERATION OF $U_{37}^{K'}$	244
4. OVERALL IMPLICATIONS FOR POM DEGRADATION MECHANISMS.....	248

CHAPITRE VII: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....253

1. LES PRINCIPALES CONCLUSIONS DE CE TRAVAIL.....	255
1.1. LES EFFETS DES PROCESSUS DIAGENETIQUES SUR LES ALCENONES	255
1.1.1. Des bactéries capables de dégrader les alcénones: quel impact sur les estimations de paléotempérature?	255
1.1.2. Les processus d'autoxydation et de stéréomutation peuvent ils induire un biais significatif des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dans le milieu naturel ?.....	256
1.2. LA CORRECTION DES BIAIS RESULTANT DE LA DIAGENESE DES ALCENONES EST-ELLE POSSIBLE?	257
1.3. DES RELATIONS HAPTOPHYTES-BACTERIES COMPLEXES	258
1.4. L' $U_{37}^{K'}$, UN BON PALEOMARQUEUR DES TEMPERATURES DES EAUX DE SURFACE?	259
2. LES PERSPECTIVES.....	260
2.1. SPECIFICITE DES BACTERIES ASSOCIEES AUX CELLULES D' E. HUXLEYI?.....	260
2.2. PRESENCE DE BACTERIES APTES A DEGRADER SELECTIVEMENT LES ALCENONES IN SITU?	261
2.3. VALIDITE DES "COURBES CORRECTIVES" ?.....	261
2.4. INHIBITION DU TRANSFERT D'OXYGENE SINGULET DU PHYTOPLANCTON AUX BACTERIES ASSOCIEES PAR LA SILICE ?	261
2.5. LA STEREOMUTATION DES ALCENONES EST-ELLE POSSIBLE DANS DES CONDITIONS AEROBIES?	262
2.6. LE CAS PARTICULIER DE LA MER NOIRE	262

CHAPITRE VIII: PARTIE EXPERIMENTALE	265
1. MICRO-ORGANISMES ET CONDITIONS DE CULTURES	267
1.1. LES SOUCHES ALGALES	267
1.2. LES DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES	267
1.3. LE MILIEU ET LES CONDITIONS DE CULTURE D'E. HUXLEYI TWPI	267
1.4. ISOLEMENT DE SOUCHES BACTERIENNES A PARTIR DES CULTURES D'E. HUXLEYI TWPI.....	268
1.5. MILIEUX ET CONDITIONS DE CROISSANCE DES CULTURES BACTERIENNES.....	268
1.5.1. Les substrats	268
1.5.1.1. Les cellules lyophilisées d'E. huxleyi CS-57	268
1.5.1.2. Les alcénones en C ₃₇ purifiées à partir des cellules d'E. huxleyi CS-57.....	268
1.5.2. Milieux et conditions de croissance.....	269
2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	269
2.1. L'EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE CULTURES BACTERIENNES.....	269
2.2. LES REACTIONS EN CHAINE PAR POLYMERASE (PCRs).....	270
2.2.1. La PCR-DGGE.....	270
2.2.2. Amplification du gène codant pour le 16S rRNA	270
2.3. L'ELECTROPHORESE SUR GEL EN GRADIENT DENATURANT (DGGE).....	271
2.4. LE SEQUENÇAGE ET L'ANALYSE PHYLOGENIQUE	272
3. TRAITEMENTS CHIMIQUES	273
3.1. EXTRACTION LIPIDIQUE	273
3.1.1. La méthode appliquée sur les échantillons obtenus in vitro.....	273
3.1.2. La méthode appliquée sur les échantillons prélevés in situ en mer Méditerranée et dans l'océan Pacifique équatorial.....	273
3.1.3. La méthode appliquée sur les échantillons prélevés in situ en Alaska.....	273
3.2. HYDROLYSE ALCALINE	274
3.3. HYDROLYSE ACIDE	274
3.4. PURIFICATION DES ALCENONES.....	274
3.4.1. Purification sur colonne.....	274
3.4.2. Adduction à l'urée	275
3.5. REDUCTION AU NABH ₄	275
3.6. HYDROGENATION	275
3.7. METHYLATION	275
3.8. FORMATION DE PYRROLIDIDES AFIN DE DETERMINER LES POSITIONS DES DOUBLES LIAISONS	276
3.9. DERIVATISATION.....	276
3.10. OBTENTION DE STANDARDS DES PRODUITS DE DEGRADATION DES Δ ⁵ -STEROLS.....	276
3.11. OBTENTION DE STANDARDS DES ALCENONES.....	276
3.12. ANALYSES A L'AIDE DE COUPLAGES CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE-SPECTROMETRE DE MASSE TRAVAILLANT EN IMPACT ELECTRONIQUE (CPG-SMIE).....	277
3.12.1. Les analyses du contenu en alcénones.....	277
3.12.2. Les analyses du contenu en acides gras.....	277
3.13. ANALYSES EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DETECTION EN IONISATION DE FLAMME (CPG-FID) 278	
4. LES DIFFERENTS SITES D'ETUDES	278
4.1. LA MER MEDITERRANEE	278
4.1.1. Description du site d'étude.....	278
4.1.2. Echantillonnage	279
4.2. L'ALASKA	280
4.2.1. Description du site d'étude.....	280
4.2.2. Echantillonnage	281
4.3. L'OCEAN PACIFIQUE EQUATORIAL	281
4.3.1. Description du site d'étude.....	281
4.3.2. Echantillonnage	282
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	283
ANNEXES	319

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE I

Fig. I-1. Chromatogramme issu de l'analyse en CLHP-SM d'échantillons de (a) la surface du sédiment provenant de la station Halley Bay en Antarctique (b) la surface du sédiment provenant de la mer d'Arabie. Les chiffres romains indiquent la structure des molécules représentées ci-contre (Schouten et al., 2002)...... 36

*Fig. I-2. Chromatogramme réalisé en CPG-SM illustrant la distribution des haslènes dans des cultures de *H. ostrearia* ayant poussé à 5°C (27 jours), 15°C (7 jours) et 25°C (10 jours). La structure des haslènes est représentée ci-contre (Belt et al., 1994, 1996; Johns et al., 1999; Wraige et al., 1999) (Rowland et al., 2001b).*..... 37

Fig. I-3. Chromatogramme en ion total mettant en évidence les principales alcénones et leurs spectres de masse. 38

*Fig. I-4. Photographie d'une cellule d'*E. huxleyi* observée au microscope électronique à balayage...* 40

*Fig. I-5. Photographie d'une cellule de *G. oceanica* observée au microscope électronique.*..... 40

Fig. I-6. Structure des alcénones les plus communes...... 43

Fig. I-7. Voie biosynthétique de la chaîne carbonée des molécules d'alcénones à partir du primer acetyl-SCoA (Proposée par Rontani et al., 2006c). 47

Fig. I-8. Voie biosynthétique de la chaîne carbonée des molécules d'alcénones à partir du primer propionyle-ScoA (Rontani et al., 2006c)...... 48

*Fig. I-9. Voie biosynthétique de la formation des alcénones à courtes chaînes carbonées produites par la souche d'*E. huxleyi* sp. CCMP1742 (Rontani et al., 2006c).*..... 49

Fig. I-10. Voie de désaturation proposée pour la chaîne carbonée des différentes familles d'alcénones (Rontani et al., 2006c)...... 50

*Fig. I-11. Mise en évidence au microscope à épifluorescence de la présence d'inclusions riches en alcénones dans le cytoplasme d'*Isochrysis galbana* (a) et d'*Emiliana. huxleyi* (b) (Eltgroth et al., 2005).*..... 51

Fig. I-12. Formation et analyse des alcénols silylés. 55

Fig. I-13. Analyses par CPG-SMEI (avant et après réduction-silylation) du contenu en alcénones d'un extrait lipidique obtenu à partir d'un échantillon de matériel particulaire prélevé par trappe à la station DYFAMED. 56

*Fig. I-14. Chromatogramme montrant la distribution des alcénones présentes dans des cultures d'*E. huxleyi* maintenues à 25°C et 10°C (Prahl & Wakeham, 1987).* 57

*Fig. I-15. Courbes stratigraphiques obtenues à partir d'échantillons de carottes sédimentaires provenant de l'est de l'Atlantique équatorial, de (a) l'indice d'insaturation des alcénones (U_{37}^K) et des valeurs de $\delta^{18}O$ des foraminifères (b) *G. sacculifer* (c) *G. rubens* et (d) *C. Wuellerstorfi* durant ces 120 000 dernières années (Brassell et al., 1986).*..... 59

Fig. I-16. Relation linéaire entre les maSSTs (0m) et les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ calculées à partir d'échantillons de sédiments de surface provenant de diverses zones océaniques du monde entre 60°S et 60°N. Les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ proviennent de plusieurs données de la littérature (Sikes et al., 1991, 1997; Rosell-Melé et al., 1995b; Pelejero & Grimalt, 1997; Sonzogni et al., 1997b; Müller et al., 1998) et les données de températures proviennent de Levitus et Boyer (1994) et des archives de COADS (adaptée de Müller et al., 1998).	63
Fig. I-17. Variation de la composition isotopique en hydrogène des alcénones C_{37} et C_{38} provenant de cultures d' <i>E. huxleyi</i> en fonction de la composition isotopique en hydrogène du milieu de culture (Englebrecht & Sachs, 2005).	66
Fig. I-18. Partie du rayonnement solaire atteignant la surface des eaux (longueurs d'ondes en nm). 92	
Fig. I-19. Réactions de photo-oxydation induites de type I et II à partir de l'état du triplet du photosensibilisateur (Rontani, 2001).	93
Fig. I-20. Devenir de l'énergie d'excitation de la chlorophylle dans des cellules phytoplanctoniques en bon état physiologique (Rontani, 2001).	94
Fig. I-21. Devenir de l'énergie d'excitation de la chlorophylle dans des cellules phytoplanctoniques sénescents (Rontani, 2001).	94
Fig. I-22. Les trois grandes étapes des réactions radicalaires en chaîne des processus d'autoxydation.	96
Fig. I-23. Mécanismes d'autoxydation des alcénones (Proposés par Rontani et al., 2006b), a,b,c et d représentent les différents produits d'autoxydation (diols insaturés) identifiés.	98
Fig. I-24. Caractérisation par CPG-SMEI des diols insaturés résultant de l'autoxydation de l'alcénone en $C_{37:3}$ après silylation (Rontani et al., 2006b).	98
Fig. I-25. Exemple de produits d'autoxydation résultant de l'autoxydation des Δ^5 -stéroïdes.	100
Fig. I-26. Voies métaboliques potentiellement impliquées lors de la dégradation bactérienne aérobie des alcénones non sélective: attaque des groupements méthyles et cétoniques (Rontani et al., 2008).	104
Fig. I-27. Voies métaboliques potentiellement impliquées lors de la dégradation bactérienne aérobie sélective des alcénones: attaque au niveau des doubles liaisons (Rontani et al., 2008).	104
Fig. I-28. Chromatogramme partiel d'un extrait lipidique total réduit au $NaBH_4$ et silylé, montrant la présence d'époxyalcénones après incubation de la souche <i>E. huxleyi</i> TWPI avec la communauté bactérienne ATB3 durant 20 jours.	105
Fig. I-29. Voie métabolique proposée pour la dégradation de l'alcénone en $C_{37:3}$ impliquant l'époxydation initiale de la double liaison en position $\omega 29$ (Rontani et al., 2008).	106
Fig. I-30. Réaction des radicaux thiyles avec les doubles liaisons des alcénones (Rontani et al., 2006a).	108
Fig. I-31. Chromatogrammes partiels en ions totaux (TIC) montrant la distribution d'alcénones intactes et stéréomutées dans une fraction d'alcénones di-insaturées purifiée à partir de cellules d' <i>E.</i>	

huxleyi CS-57 avant (A) et après (B) incubation de 7 jours dans un mélange méthanol/éthanethiol et dans l'extrait lipidique total de cellules mortes de la même souche avant (C) et après (D) incubation de 10 jours dans de l'eau de mer contenant de l'éthanethiol (Rontani et al., 2006c)..... 110

Fig. I-32. Mécanismes proposés pour la formation de radicaux thiyles inducteurs de stéréomutation dans (a) des conditions oxydiques (en bleu) et (b) sulfato-réductrices (en rouge). (Me^n = ions métalliques, e.g. Fe^{3+} , adaptée de Rontani et al., 2006b). 112

Fig. I-33. Analyse en CPG-SMEI en mode SIM de l'extrait lipidique de matériel particulaire prélevé à 100 m en mer Noire montrant la présence d'alcénones stéréomutées (Rontani et Wakeham, 2008). 115

Fig. I-34. Variation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ en fonction du pourcentage d'alcénones en $MeC_{37:2}$ stéréomutées, observée par Rontani et al. (2006a) durant des incubations de *C. lamellosa* dans un mélange méthanol-éthanethiol. Déterminé après réduction au $NaBH_4$ et silylation (Rontani & Wakeham, 2008). 115

Fig. I-35. Analyse en CPG-SMEI en mode SIM de l'extrait lipidique d'un échantillon de matériel particulaire collecté à 800 m en mer Noire, après réduction au $NaBH_4$ et silylation, montrant la présence d'époxyalcénones et leurs spectres de masse (Rontani & Wakeham, 2008). 116

Fig. I-36. Les différents traceurs de la dégradation biotique et abiotique du Δ^5 -stérols, proposés par Rontani et al. (2009). 118

Tableau I-1. Les principales sources de données paléoclimatiques (adapté de Bradley, 1999)..... 31

Tableau I-2. Présence des alcénones dans des environnements particuliers..... 41

Tableau I-3. Différentes calibrations établies à partir d'expérimentations en laboratoire (incubations de cultures d'*E. huxleyi*, *G. oceanica*, *I. galbana* et *C. lamellosa*). 61

Tableau I-4. Différentes calibrations établies à partir de l'analyse d'échantillons de matière organique particulaire en fonction des zones géographiques..... 62

Tableau I-5. Différentes calibrations établies à partir de l'analyse d'échantillons de sédiments de surface ou de carottes sédimentaires en fonction des zones géographiques..... 62

Tableau I-6. Tableau récapitulatif des différentes relations mises en évidence entre le $\%C_{37:4}$ et la salinité 67

Tableau I-7. Liste (non exhaustive) des différentes études mettant en évidence une bonne corrélation entre les SSTs enregistrées par les alcénones et les SSTs actuelles. 68

Tableau I-8. Liste (non exhaustive) des différentes études mettant en évidence une bonne corrélation entre les SSTs (ou PCO_2) enregistrées par les alcénones et les SSTs passées (ou paléo- CO_2). 69

Tableau I-9. Liste (non exhaustive) des différentes études mettant en évidence une corrélation entre les paléoSSTs (ou paléosalinité*) enregistrées par les alcénones et les informations apportées par d'autres proxies. 70

Tableau I-10. Liste (non-exhaustive) de différentes études mettant en évidence des incohérences observées entre les températures calculées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ et les SSTs mesurées in situ. 75

Tableau I-11. Liste (non-exhaustive) de différentes études mettant en évidence des incohérences observées entre les températures calculées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ et les températures passées déterminées à l'aide d'autres paléomarqueurs.	76
Tableau I-12. Récapitulatif de quelques exemples de profondeurs de production maximale des alcénones par les haptophytes en fonction des zones géographiques.	83
Tableau I-13. Récapitulatif de quelques exemples de périodes de blooms d'haptophytes productrices d'alcénones en fonction des zones géographiques. Les saisons indiquées en gras représentent les blooms principaux.	84
Tableau I-14. Composition en alcénones chez différentes espèces d'haptophytes	86

CHAPITRE II

Fig. II-1. DGGE separation patterns of PCR-amplified sequences of 16S rRNA genes derived from <i>Emiliana huxleyi</i> cultures (lanes 1 and 2) and from strains isolated from the same cultures: <i>Oceanicaulis alexandrii</i> sp. AG5, #5 (lane 4); <i>O. alexandrii</i> sp. AG9, #5 (lane 5); <i>Sphingomonas</i> sp. AG6, #6 (lane 6); <i>O. alexandrii</i> sp. AG7, #5 (lane 7); <i>O. alexandrii</i> sp. AG4, #5 (lane 8); <i>Dietzia maris</i> sp. S1, #1 (lane 9); <i>Marinobacter</i> sp. S2, #3 (lane 10); <i>Nocardioides</i> sp. S3, #4 (lane 11), <i>Micrococcus</i> sp. AG10, #7 (lane 13); <i>Stappia</i> sp. AG2, #2 (lane 14). Lanes 3 and 12: migration standard from top to bottom (<i>Clostridium perfringens</i> , 560 bp, G1C = 52.8%; <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , 580bp, G1C = 51%; and <i>Micrococcus luteus</i> , 571bp, G1C = 57.6%).	131
Fig. II-2. Degradation of alkenones observed after incubation of sterile cells of the <i>Emiliana huxleyi</i> strain CS-57 with the strain <i>Dietzia maris</i> sp. S1.	135
Fig. II-3. Partial m/z 117, 512 and 514 mass fragmentograms of silylated $NaBH_4$ -reduced total lipid extracts obtained after incubation of a purified C_{37} - C_{39} methyl alkenone fraction before (a) and after (b) incubation with <i>Dietzia maris</i> sp. S1 for 1 week. Note the occurrence of epoxyalkenones in the latter due to epoxidation of one of the double bonds in the parent alkenone (i.e. the methyl $C_{37:3}$ alkenone gives rise to three methyl $C_{37:2}$ epoxyalkenones and the methyl $C_{37:2}$ alkenone gives rise to two methyl $C_{37:1}$ epoxyalkenones), both analysed as the alcohols following $NaBH_4$ reduction.	136
Fig. II-4. Partial m/z 299, 313, 397, 411, 495 and 509 mass fragmentograms (recorded at 15 eV) of silylated $NaBH_4$ -reduced and hydrogenated total lipid extracts obtained after incubation of a purified C_{37} - C_{39} methyl alkenone fraction with <i>Dietzia maris</i> sp. S1 for 1 week.	137
Fig. II-5. Proposed pathways for the biodegradation of the $C_{37:3}$ alkenone by the strain <i>Dietzia maris</i> sp. S1 involving initial epoxidation of the $\omega 29$ double bond.	139
Table II-1. Degradation of alkenones observed after incubation of sterile cells of <i>Emiliana huxleyi</i> strain CS-57 with the different isolates	138
Table II-2. Degradation of alkenones observed after incubation of sterile cells of <i>Emiliana huxleyi</i> strain CS-57 with the strains <i>Dietzia maris</i> sp. S1, <i>Marinobacter</i> sp. S2 and <i>Nocardioides</i> sp. S3	134

CHAPITRE III

Fig. III-1. Proposed formation pathways of 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid from cis-vaccenic acid (adapted from Shirasaka et al., 1997). 159

Fig. III-2. EI mass spectra of trimethylsilyl ester derivatives of 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic fatty acid (A) and 10,13-epoxy-11(Δ^3)-methyloctadeca-10,12-dienoic FA (B). 160

Fig. III- 3. EI mass spectra of methyl esters of 11-methyloctadec-12-enoic fatty acid (A); (11- Δ^3)-methyloctadec-12-enoic fatty acid (B); and (11- Δ^3)-methyloctadecanoic FA (obtained after catalytic hydrogenation of the corresponding unsaturated acid) (C). 161

Fig. III- 4. EI mass spectrum of trimethylsilyl ether/ester derivatives of isomeric C₃₄ mycolic acids. 162

Table III-1. FA composition of bacterial strains isolated from *E. huxleyi* strain TWP1 cells. 153

Table III-2. Mycolic acid composition of strain *D. maris* sp. S1. 163

CHAPITRE IV

Fig. IV-1. Mass spectrometric characterization of sterols and their degradation products (the example given is cholesterol)..... 177

Fig. IV-2. Pathways of proposed tracers for biotic and abiotic degradation of Δ^5 -sterols..... 179

Fig. IV-3. Partial m/z 458, 456, 403, 474, 460 mass fragmentograms of total lipid extracts showing the presence of cholesterol degradation products in suspended particulate matter collected at 100 m. . 181

Fig. IV-4. Chlorophyll concentration and percentages of biotic and abiotic degradation products for cholest-5-en-3 β -ol (A) and 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol (B) in the samples investigated. (Abiotic degradation products include photo- and autoxidation products). 182

Fig. IV-5. Partial m/z 117 and 131 mass fragmentograms of silylated NaBH₄-reduced total lipid extracts showing the presence of alkenols in suspended particulate matter collected at 5 m..... 184

Fig. IV-6. Partial m/z 276, 278, 290, 304 mass fragmentograms of 3-hydroxyhexatriaconta-14,21-diene (obtained after NaBH₄ reduction of the alkenone fraction of the *E. huxleyi* strain CCMP 1742 now producing strong proportion of shorter alkenones; Prahl et al., 2006b) (A), 3-hydroxyhexatriaconta-16,21-diene (obtained after NaBH₄ reduction of the alkenone fraction of Unit II Black Sea sediments) (B) and silylated NaBH₄-reduced EtC_{36:2} alkenone present in the sample collected at 5 m (C). 185

Fig. IV-7. U₃₇^{K'} index and percentages of 5,6-epoxycholestan-3 β -ol and 5,6-epoxy-24-ethylcholestan-3 β -ol measured in the samples investigated. 187

Fig. IV- 8. Partial m/z 512.5, 514.5, 526.5, 528.5 mass fragmentograms showing the presence of stereomutated silylated alkenols in the top layer (0–0.5 cm) of sediments..... 189

Table IV-1. Concentration of free Δ^5 -sterols and POC in the suspended particulate matter samples investigated. 178

Table IV-2. Alkenone concentration and unsaturation ratio in the suspended particulate matter samples investigated..... 186

CHAPITRE V

Fig. V-1. Map showing the location of the 27 sites in SE Alaskan study region where surface sediments were obtained by multicorer. Colored circles represent 20 sites where alkenones were detected and quantified. The color of each circle indicates the total organic carbon-normalized concentration of C_{37} alkenones (K37s) measured at each of these sites (see colorbar for scale). Unfilled circles identify the 7 core sites where alkenones were below detection. The offshore region of the map is annotated with a grey line, indicating the 200 m isobath, and arrows, showing the overall regional pattern of physical oceanographic circulation (adapted from figure in Reed and Schumacher, 1987). 200

Fig. V-2. (A) Example of a gas chromatogram obtained from GC-FID analysis of alkenone fractions. Chromatographic peaks corresponding to the tri-unsaturated (K37:3m) and di-unsaturated (K37:2m) C_{37} methyl ketones and the similarly unsaturated (:3, :2), C_{38} (K38) and C_{39} (K39) methyl (m) and ethyl (e) ketones are labeled. (B) Partial m/z 117, 131, 512.5, 514.5, 526.5 and 528.5 mass fragmentograms from GC-EIMS analysis showing the presence of diols (as silylated derivatives) produced from $NaBH_4$ reduction of epoxyketones in the alkenone fractions. See experimental section for further details about this analytical procedure and the diagnostic mass spectral ions employed to identify and quantify these bacterial oxidation products of alkenones. 206

Fig. V-3. (A) Water temperature estimates derived using a standard calibration equation ($U_{37}^{K'} = 0.034T + 0.039$; Prahl et al., 1988) from $U_{37}^{K'}$ measurements uncorrected (filled squares) and corrected (open squares) for apparent "warming" effects gauged empirically by the epoxyketone composition detected in each sample (see text for further details). Sampling sites are arranged according to latitude with 03 (Trough West of Dall Island) being the most southerly ($\sim 54.8^\circ N$) and 81 (Bering Trough) the most northerly ($\sim 59.9^\circ N$). The vertical dotted line divides sites located south (left) and north (right) of Icy Strait ($\sim 58^\circ N$). (B) Comparison of the average $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimate derived from analysis of surface sediments throughout our study area ($11.8 \pm 1.0^\circ C$) with mean sea-surface temperature (SST) reported for winter ($5.2 \pm 0.9^\circ C$), annual ($8.3 \pm 0.6^\circ C$) and summer ($12.3 \pm 0.4^\circ C$) time frames in this region (see Table V.1 and text for further details)..... 208

Fig. V-4 . Empirical calibration of apparent diagenetic "warming" effect on $U_{37}^{K'}$ values caused by compound selective decomposition of alkenones in cell debris from *E. huxleyi* by microbial communities under laboratory-controlled, aerobic incubation conditions (data from **Table V-2**). The dashed curve ($y = 110x^2 + 4.84x$, $r^2 = 0.987$) represents a quadratic best-fit of the complete experimental data set summarized in **Table V-2**. Refer to the text for further details. 213

Fig. V-5. (A) Map of "residual" between $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimate for surface sediment and mean annual sea-surface temperature (maSST) in waters overlying the site where each core-top sample was collected. The magnitude of the model "residual" in temperature ($^\circ C$) at each site is indicated by the color of the filled circle (see colorbar for scale). The mapped data set includes samples from: our study area in the subarctic Pacific Ocean (Table V-1), the NE Pacific continental margin extending from the tip of Baja to the Washington coast (Prahl et al., 1988; Doose et al., 1997; Herbert et al., 1998; Electronic annex), the Gulf of California (Goni et al., 2001), the SE Pacific along the Peru-Chile continental margin (McCaffrey et al., 1990; Prahl et al., 2006a) and the open

ocean in the subarctic North Atlantic (Rosell-Melé et al., 1995b). $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimates were calculated using the standard calibration equation ($U_{37}^{K'} = 0.034T + 0.039$) of Prahla et al. (1988). *maSST* values were obtained for each sampling site from the 2001 World Ocean Atlas (<http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOA01/woa01dat.html>). Graphs to the right of the map show: (B) winter, mean annual and summer SST and (C) winter and summer phosphate concentrations measured in surface waters as a function of latitude along the Pacific continental margin of North and South America. These data were also obtained from the 2001 World Ocean Atlas..... 216

Table V-1. Summary of alkenone and ancillary data obtained from analysis of SE Alaskan surface sediments..... 202

Table V-2. Summary of results from analysis of epoxyketones in samples from laboratory experiments involving controlled aerobic microbial degradation of alkenones contained within *E. huxleyi* cell debris..... 209

CHAPITRE VI

Fig. VI-1. Formulae and potential applications of the different lipid tracers of degradation processes employed in the present work..... 233

Fig. VI-2. CPPI-derived chlorophyll photodegradation estimates (A) and 3,7,11,15-tetramethylhexadecan-2-ene-1,4-diol percentage (relative to intact phytol) (B) in the different suspended and sinking particle samples investigated. 235

Fig. VI-3. Oleic acid photooxidation (A) and autoxidation (B) percentages in the different suspended and sinking particle samples investigated. These values were calculated from 8-hydroxyoctadec-9(cis)-enoic, 8-hydroxyoctadec-9(trans)-enoic, 11-hydroxyoctadec-9(cis)-enoic, 11-hydroxyoctadec-9(trans)-enoic, 9-hydroxyoctadec-10(trans)-enoic and 10-hydroxyoctadec-8(trans)-enoic acid concentrations as indicated in the text. 237

Fig. VI-4. Cis-vaccenic acid photooxidation (A) and autoxidation (B) percentages in the different suspended and sinking particle samples investigated. These values were calculated from 10-hydroxyoctadec-11(cis)-enoic, 10-hydroxyoctadec-11(trans)-enoic, 13-hydroxyoctadec-11(cis)-enoic, 13-hydroxyoctadec-11(trans)-enoic, 11-hydroxyoctadec-12(trans)-enoic and 12-hydroxyoctadec-10(trans)-enoic acid concentrations as indicated in the text. 239

Fig. VI- 5. 24-Methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol (A), 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol (B) and cholest-5-en-3 β -ol (C) degradation product percentages in the different suspended and sinking particle samples investigated. (24-methylcholest-22-en-3 β ,5 α ,6 β -triol could not be detected in sinking particles). ... 243

Fig. VI-6. Partial *m/z* 117, 131, 299, 313, 512 and 514 mass chromatograms of the total lipid extract obtained from the sinking particle sample collected at 955 m showing the presence of a diol resulting from NaBH_4 -reduction and silylation of $\text{C}_{37:2}$ and $\text{C}_{37:3}$ alkenone-derived epoxide. For simplification only one isomeric epoxyalkenone was represented..... 247

Fig. VI-7. Conceptual model showing the relative importance of photooxidation ($h\nu$), autoxidation ($\text{RO}\cdot$) and bacterial biodegradation on autochthonous phytodetritus and allochthonous vascular plant lipids in sinking and suspended particles. The important role played by zooplankton (ZP) in OM degradation is included in the schematic but was not discussed extensively in the text. Both zooplankton grazing and physical processes affect exchange of POM via aggregation and

disaggregation. Sizes of open arrows indicate relative importance of each degradative process. In general, suspended lipids are most susceptible to photooxidation in the photic zone, with transfer of photooxidatively produced singlet oxygen inhibiting bacterial degradation. Sinking POM is less affected by photooxidation and thus more susceptible to bacterial degradation. Terrigenous material is most affected by autoxidation, either on land or during atmospheric transport to the ocean..... 250

Table V-1. Summary of alkenone and ancillary data obtained from analysis of SE Alaskan surface sediments..... 202

Table V-2. Summary of results from analysis of epoxyketones in samples from laboratory experiments involving controlled aerobic microbial degradation of alkenones contained within E. huxleyi cell debris..... 209

CHAPITRE VII

Tableau VII-1. Tableau récapitulatif des différents processus de dégradation des alcénones, de leurs impacts sur les estimations de paléotempératures et de leurs corrections 258

CHAPITRE VIII

Fig. VIII-1. Carte situant le site Medflux/Dyfamed en mer Méditerranée..... 279

Fig. VIII-2. Carte montrant la localisation des 27 sites d'étude du sud-est de l'Alaska où la surface du sédiment a été obtenue par carottage (Prahl et al., 2010)..... 280

Fig. VIII- 3. Carte situant la zone du Pacifique équatorial étudiée (0°N-140°W)..... 281

Tableau VIII-1. Séquences des amorces utilisées..... 271

LISTE DES ABREVIATIONS

(Par ordre alphabétique)

- $\delta^{18}\text{O}$: Composition isotopique de l'oxygène
- δD : Composition isotopique de l'hydrogène
- $^1\text{O}_2$: Oxygène singulet
- $U_{37}^{K'}$: Indice du taux d'insaturation des alcénones en C_{37}
- **ACP**: Acyl Carrier Proteins
- **ADN**: Acide désoxyribonucléique
- **ARN**: Acide ribonucléique
- **CCD**: Carbonate Compensation Depth = Seuil de compensation des carbonates
- **CDGTs** : Tétraéthers isoprénoides glycérol dialkyle glycérol
- **Ch.**: Chapitre
- **CLHP-SM**: Chromatographie liquide haute performance associée à un spectre de masse.
- **CLIMAP**: Climate: Long range Investigation, Mapping, and Prediction
- **CPG-SM**: Chromatographie en phase gazeuse associée à un spectromètre de masse
- **CPG-SMIE**: Chromatographie en phase gazeuse associée à un spectromètre de masse en impact électronique
- **CTAB**: Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
- **DGGE**: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis = Electrophorèse sur gel à gradient dénaturant
- **DMSP**: β -dimethylsulfoniopropionate
- **EDTA**: Ethylène diamine tétra-acétate
- **EpC_{37:2} et EpC_{37:3}**: Epoxyalcénones résultantes de la dégradation des alcénones parentes $\text{C}_{37:2}$ et $\text{C}_{37:3}$
- **FA**: Fatty Acid = Acides gras
- **GIEC**: Groupe intergouvernemental d'experts sur l'évolution du climat
- **HBI** : Highly Branched Isoprenoids = Isoprénoides hautement branchés
- **Ma** : Millions d'années
- **maSST**: Température moyenne annuelle des eaux de surface
- **PaléoSSTs** : Paléotempératures des eaux de surface
- **Pb**: Paire de bases
- **PCO₂**: Pression partielle en CO_2
- **PCR**: Polymerase Chain Reaction= Réactions en chaîne par polymérase
- **Ppb**: Parts-per-billion = Partie par milliard
- **Ppm**: Parts-per-million = Partie par million
- **Rpm**: Revolution per minute= Rotation par minute
- **SIM** : Selected Ion Monitoring
- **SSTs** : Sea surface temperature : Température des eaux de surface
- **TAE**: Tris-acétate-EDTA

Ère	Période	Epoque	Etage	Age (en Ma)	
Cénozoïque	Quaternaire	Holocène		0	
		Pléistocène		-1,8	
	Tertiaire	Néogène	Pliocène	Sup.	Gélacien
				Moy.	Plaisancien
				Inf.	Zancléen
		Miocène	Sup.	Messinien	
				Tortonien	
			Moy.	Serravallien	
				Langhien	
				Burdigalien	
			Inf.	Aquitaniens	
			Paléogène	Oligocène	
				Rupélien	
	Eocène	Sup.		Priabonien	
		Moy.		Bartonien	
		Inf.		Lutétien	
	Paléocène			Yprésien	
				Thanétien	
				Danien	
	Mésozoïque ou secondaire	Crétacé	Supérieur	Maastrichien	
Campanien					
Santonien					
Coniacien					
Turonien					
Cénomaniens					
Inférieur			Albien		
			Aptien		
			Barrémien		
			Hauterivien		
		Valanginien			
		Berriasien			
		Jurassique	Supérieur	Tithonien	
				Kimméridgien	
Oxfordien					
Moyen			Callovien		
			Bathonien		
			Bajocien		
			Aalénien		
Inférieur			Toarcien		
			Pliensbachien		
		Sinemurien			
Trias		Supérieur		Hettangien	
				Rhétien	
				Norien	
				Carnien	
		Moyen		Ladinien	
				Anisien	
Inférieur		Scythien			

Echelle des temps géologiques

Introduction générale

L'intérêt grandissant pour le changement climatique global de notre planète nécessite une bonne connaissance à la fois du cycle du carbone et du suivi des enregistrements paléoclimatiques. La température moyenne de la Terre a augmenté de 0,75°C depuis 1860 (GIEC, 2007). Bien que nous soyons dans une phase naturelle de réchauffement climatique de notre planète (période interglaciaire de l'Holocène qui a commencé à la fin du Pléistocène, il y a environ 11 400 ans), cette augmentation des températures s'accélère dangereusement depuis l'ère industrielle (années 70). Les conséquences de ce réchauffement sont plutôt alarmantes et pourraient résulter en des bouleversements environnementaux majeurs tels que le retrait des glaciers, la fonte de la banquise, l'élévation du niveau moyen des océans, la modification des régimes de précipitations (inondations et sécheresses) ou encore la modification de la circulation de courants marins comme le Gulf Stream qui pourrait conduire au refroidissement de certaines régions (Europe et régions de hautes latitudes).

Afin de répondre à la question au centre des préoccupations écologiques actuelles, à savoir quel est le réel impact de l'industrialisation (émissions anthropiques de gaz à effet de serre tels que le dioxyde de carbone, le méthane, etc.) sur le réchauffement climatique de la planète, il est nécessaire de bien connaître l'amplitude et les fréquences des variations naturelles des températures. Pour cela, la paléoclimatologie dispose d'un certain nombre d'indicateurs globaux ou locaux (paléomarqueurs) permettant d'établir les conditions environnementales des ères passées, sur des milliers voire des millions d'années, notamment en terme de paléotempératures. Le climat de la Terre résulte d'interactions complexes, essentiellement entre l'atmosphère et les océans. Occupant plus de 70% de la surface de la planète, les océans sont une importante source d'informations paléoclimatiques. La reconstruction des climats a pu être réalisée à partir de plusieurs types de paléomarqueurs océaniques tels que la composition en isotopes de l'oxygène, les assemblages faunistiques ou la minéralogie de l'argile. Cependant, ces paléomarqueurs ont montré leurs limites. Soit par l'apport de données qualitatives peu précises, soit par l'influence de paramètres extérieurs pouvant fortement influencer sur les résultats obtenus.

Dans le milieu des années 80, la découverte des alcénones (cétones insaturées à longue chaîne) et leur fonction de paléothermomètre a révolutionné la recherche paléoclimatique. En effet, l'utilisation des alcénones s'est révélée être une source d'informations précises ces 30 dernières années. Ce nouvel outil permettant d'estimer quantitativement les paléotempératures moyennes annuelles de surface des océans (maSSTs), des mers et éventuellement des environnements lacustres (mais aussi potentiellement la PCO₂ et la salinité), semblait être une bonne solution alternative aux méthodes classiques utilisées en paléoclimatologie

(assemblages faunistiques, isotopes de l'oxygène dans les foraminifères, etc.) qui fournissaient fréquemment des données erronées du fait de facteurs incontrôlables tels que le volume des glaces, la salinité, la niche écologique des différentes espèces étudiées ou encore la dissolution du calcaire. Par conséquent, suite à leur découverte, les alcénones sont très rapidement devenues un des outils les plus utilisés dans les études de paléoclimatologie (ubiquité, peu d'espèces productrices, apparente robustesse vis à vis des processus de dégradation, etc.). Cependant, dans les années 2000, plusieurs études ont mis en évidence l'existence de processus de dégradation abiotique puis biotique agissant sur les alcénones et pouvant modifier le signal climatique enregistré par ces molécules. Ainsi des incertitudes, quant à l'efficacité et à l'exactitude des données de maSSTs obtenues à partir de ces paléomarqueurs, ont vu le jour.

L'objectif général de ce travail a consisté à étudier les effets des processus diagénétiques (autoxydation, dégradation bactérienne et stéréomutation) sur le devenir des alcénones et leur impact sur les estimations de paléotempératures. Une première partie (effectuée en collaboration avec le Dr. J.K. Volkman, Australie), a consisté à prouver *in vitro* que de nombreuses souches bactériennes associées aux cellules d'*E. huxleyi* (principale haptophyte productrice d'alcénones) étaient capables de dégrader significativement les alcénones en mettant en évidence que dans certains cas cette biodégradation pouvait entraîner une surévaluation des températures enregistrées par ces composés. La seconde partie (effectuée en collaboration avec les Drs. F.G. Prahl et S.G. Wakeham, USA), avait pour buts, d'identifier et d'évaluer l'importance *in situ* de ces processus de dégradation biotique et abiotique et d'essayer d'apporter une correction aux différents biais résultant de la diagenèse des alcénones dans le but d'obtenir à partir de ces paléomarqueurs des paléotempératures plus précises.

Ce manuscrit s'articule autour de huit chapitres dont cinq chapitres de résultats présentés sous forme d'articles scientifiques publiés ou en cours de publication. Le chapitre I présente l'état des connaissances actuelles sur les alcénones, leur utilisation en tant que paléomarqueurs et les différents processus pouvant fausser les évaluations de paléotempératures basées sur ces composés. Une attention particulière a été portée sur les différents processus de dégradation (biotique et abiotique) pouvant agir sur ces molécules. Les chapitres II et III, présentent les résultats des travaux effectués *in vitro*. Le chapitre II expose la stratégie utilisée afin d'isoler et de caractériser les bactéries impliquées dans la biodégradation des alcénones. Ce chapitre introduit également les différentes voies métaboliques mises en jeu lors de la dégradation bactérienne de ces composés et met en avant l'impact non négligeable que peuvent avoir ces

processus lors de l'estimation des températures à partir des alcénones. Le chapitre III présente une étude approfondie du contenu en acides gras des différentes souches isolées et a permis de discuter de manière critique de la spécificité de certains traceurs bactériens.

Les chapitres IV, V et VI, présentent les résultats obtenus lors de l'analyse d'échantillons sédimentaires et/ou particulaires collectés respectivement en mer Méditerranée (dans le cadre du projet MedFlux), en Alaska et dans le Pacifique équatorial. Les effets des principaux processus diagénétiques (photo-oxydation, autoxydation, stéréomutation et biodégradation) sur les alcénones dans ces trois zones géographiques bien distinctes y sont discutés et une attention particulière a été portée sur les interactions pouvant exister entre les processus de dégradation biotique et abiotique.

Enfin le chapitre VII propose les principales conclusions et perspectives de ce travail.

Dans un souci de clarté, le chapitre VIII présente les différentes techniques expérimentales utilisées au cours des différentes étapes de cette thèse.

CHAPITRE I

Introduction bibliographique

1. Les paléomarqueurs

Actuellement, nous connaissons une multitude de paléomarqueurs ayant la capacité d'enregistrer des informations paléoclimatiques telles que les températures, les précipitations, la composition chimique de l'air ou de l'eau, l'activité solaire, les éruptions volcaniques, le niveau des mers, etc., sur des périodes temporelles plus ou moins longues (10^1 à 10^7 ans). Le tableau I-1 présente les principales sources d'informations paléoclimatiques. Dans cette partie, nous nous limiterons à présenter les marqueurs de paléotempératures océaniques les plus utilisés.

Tableau I-1. Les principales sources de données paléoclimatiques (adapté de Bradley, 1999)

Sources Glaciologiques (carottes glaciaires)
Géochimie (ions majeurs et isotopes de l'oxygène et de l'hydrogène) Gaz contenu dans les bulles d'air Eléments traces et microparticules Propriétés physiques
Sources Géologiques marines (carottes sédimentaires océaniques)
<i>Sédiments biogéniques (fossiles planctoniques et benthiques)</i> Composition en isotopes de l'oxygène Abondance, composition faunistique et florale Variations morphologiques Alcéones TEX86
<i>Sédiments inorganiques</i> Poussières terrestres (éoliennes) et débris transportés par la glace Minéralogie de l'argile
Sources géologiques terrestres
Dépôts de glaciers et traces de l'érosion glaciaire Traces périglaciaires Dépôts éoliens (loess et sable des dunes) Sédiments lacustres et traces d'érosion Spéléothèmes (âge et composition en isotopes stables)
Sources Biologiques
Cernes d'arbres Pollens (type, abondance relative, et/ou concentration absolue) Plantes microfossiles (âge et distribution) Insectes (assemblages) Coraux (géochimie) Diatomées ou Ostracodes dans les sédiments de lacs (assemblage, abondance, géochimie)
Sources Historiques
Enregistrements écrits d'indicateurs environnementaux Enregistrements phénologiques

1.1. La Composition faunistique

Actuellement, deux méthodes sont utilisées pour la reconstruction quantitative de paléotempératures à partir de l'abondance relative d'espèces particulières ou d'assemblages d'espèces, fossilisés dans les carottes sédimentaires océaniques. La méthode de fonction de transfert développée par Imbrie et Kipp (1971)* et la technique moderne analogue (Prell, 1985). Ces deux méthodes sont basées sur l'existence d'une relation entre la composition faunistique et la température de l'eau dans laquelle ces organismes se sont développés. L'approche générale de ces méthodes est donc de calibrer la composition en espèces d'un échantillon moderne en fonction de paramètres environnementaux modernes (tels que les températures des eaux de surface; SSTs) puis de transposer les résultats obtenus aux données fossiles (variation faunistique fossilisée dans le sédiment) afin de déterminer les conditions environnementales passées. Cette transposition n'est cependant possible que si les relations actuelles existant entre la faune marine et le climat n'ont pas été altérées au fil du temps du fait, par exemple, de l'évolution des espèces en question.

1.2. Les Isotopes de l'oxygène préservés dans les foraminifères

L'analyse de la signature isotopique de l'oxygène ($\delta^{18}\text{O}$) préservée dans les tests calcaires de microfaunes marines (principalement des foraminifères, mais également des coccolithes) est un outil très utilisé en paléoclimatologie (Hecht, 1976; Mix, 1987). Le fractionnement isotopique est la séparation partielle des isotopes d'un élément chimique au cours de processus physiques (e.g. évaporation), chimiques (e.g. réaction de précipitation) ou biologiques (e.g. biodégradation). Ce fractionnement isotopique intervient notamment au cours de la précipitation des carbonates (CaCO_3). Ces derniers sont formés à partir d'ions hydrogénocarbonates (HCO_3^-), qui sont dissous dans l'eau de mer et qui s'équilibrent isotopiquement avec l'oxygène de l'eau. Le facteur de fractionnement α est donné par la relation: $\alpha_{(c-w)} = R_c/R_w$ (où R_c est le rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ du carbonate et R_w celui de l'eau); il dépend de la température de l'eau au moment de la précipitation des carbonates. Il est difficile de mesurer précisément l'abondance isotopique d'un isotope, on compare donc les rapports isotopiques des échantillons à analyser (R_x) avec celui d'un standard (R_{st}), ce qui résulte en la notation dite "delta" exprimée en ‰ ($\delta_x = [(R_x - R_{st})/R_{st}] \cdot 10^3$). Dans le cas du

* Les références bibliographiques ont été centralisées à la fin du manuscrit

$\delta^{18}\text{O}$ le standard est la belemnite (*Belemnitella americana*) datant du crétacé antérieur. La température est obtenue à partir de l'équation empirique suivante : $t^{\circ}\text{C} = 16,9 - 4,2(\delta_{\text{c}} - \delta_{\text{w}}) + 0,13(\delta_{\text{c}} - \delta_{\text{w}})^2$ où δ_{c} correspond à la composition isotopique du carbonate de calcium et δ_{w} à celle de l'eau à partir de laquelle il a précipité. La température de l'eau de mer au sein de laquelle le calcaire s'est formé peut alors être estimée en fonction du $\delta^{18}\text{O}$ préservé dans le test des foraminifères.

1.3. Les limites des paléomarqueurs : composition faunistique et isotopes de l'oxygène

Malgré des caractéristiques très intéressantes, ces deux paléothermomètres présentent de nombreuses limites. En effet, plusieurs paramètres peuvent fausser ces estimations de paléotempératures. Le premier problème réside dans les variations potentielles de la profondeur et/ou de la saison de croissance des différentes espèces planctoniques utilisées (diatomées, foraminifères ou coccolithophores). En parallèle, une même espèce pourrait raisonnablement modifier sa niche écologique entre les périodes glaciaires et interglaciaires afin de suivre sa température optimale de croissance. Or la température de l'eau change rapidement avec la profondeur ou d'une saison à l'autre. Une faible variation peut entraîner des changements de températures de plusieurs degrés Celsius. Par conséquent, la température enregistrée à partir de ces espèces peut être mal évaluée et refléteraient plus une modification du comportement écologique de ces espèces qu'une modification des températures au cours des temps géologiques. Une autre complication importante réside dans le fait que le $\delta^{18}\text{O}$ est aussi fortement corrélé à la salinité. Des changements de salinité résultant d'un effet de dilution à large échelle (en raison de la fonte de glaciers par exemple) ou des changements locaux dus à des phénomènes de précipitations ou d'évaporations, sont aussi enregistrés dans le ratio isotopique $\delta^{18}\text{O}$ des tests calcaires des foraminifères et peuvent ainsi entraîner une surévaluation ou une sous-évaluation des enregistrements de températures à partir du $\delta^{18}\text{O}$.

A cela s'ajoute, les problèmes liés aux effets de la dissolution des carbonates avec la profondeur. Actuellement, le carbonate de calcium est essentiellement insoluble dans les eaux de surface (au-dessus de la thermocline, Olausson, 1965, 1967). Cependant après la mort des organismes, lors du dépôt des tests calcaires sur le plancher océanique, le carbonate de calcium commence à se dissoudre en atteignant la lysocline (entre 2500-4000 m de profondeur dans les océans) où la solubilité des carbonates augmente dramatiquement. Au-dessous de ce niveau, le taux de dissolution des carbonates augmente jusqu'à la profondeur,

appelée seuil de compensation des carbonates (CCD), à laquelle tous les carbonates de calcium sont dissous (Berger, 1970). Cette profondeur CCD est fonction de la solubilité du carbonate de calcium et par conséquent de la température, de la pression ou de la composition chimique de l'eau. Elle peut donc varier d'une région géographique à l'autre. Actuellement, d'environ 4200 à 4500 mètres dans l'océan Pacifique, elle se situe aux alentours des 5000 mètres dans l'océan Atlantique. Cette dissolution n'affecte pas toutes les espèces de la même façon: l'élimination sélective des espèces à paroi mince, plus fragiles, peut significativement altérer les assemblages originaux, qui ne seraient alors pas représentatifs de la productivité dans la colonne d'eau supérieure.

1.4. Les biomarqueurs moléculaires

Les biomarqueurs moléculaires ont la capacité d'enregistrer des conditions physico-chimiques (salinité, température ou teneur en oxygène, Brassell, 1992; Peters & Moldowan, 1993) dans lesquelles des organismes précurseurs vivaient. Ce sont des composés relativement stables dont les caractéristiques structurales sont restreintes à peu de groupes d'organismes, (Volkman, 1986). Les biomarqueurs s'ajoutent donc à l'arsenal d'outils climatiques de plus en plus important utilisé par les scientifiques pour reconstruire l'histoire du climat et comprendre les causes des changements climatiques.

Les avancées technologiques spectaculaires qui ont été effectuées au niveau des instruments au cours des 30 dernières années, ont permis d'améliorer considérablement les possibilités analytiques et ont largement étendu le nombre et la variété des composés organiques identifiés dans les matériaux géologiques. Notamment grâce à la précision et la haute sensibilité des couplages spectromètres de masse - chromatographes en phase gazeuse ou liquide permettant de séparer les constituants organiques de mélanges complexes présents dans les échantillons naturels et de déterminer la structure moléculaire et le ratio isotopique de composés spécifiques. Grâce à ces nouvelles technologies, de nouveaux outils de paléoclimatologie ont été développés.

1.4.1. $L'U_{37}^{K'}$

Ainsi, dans les années 80, la découverte des alcénones (Cf. Ch. I.2) a permis de définir un nouveau biomarqueur des paléotempératures des eaux de surface, l'indice $U_{37}^{K'}$ (Cf. Ch. I.3.1).

De par leur ubiquité, leur stabilité et leurs sources relativement limitées dans l'environnement marin (peu d'haptophytes étant productrices d'alcénones), ces molécules constituent de bons biomarqueurs. De plus, l'indice $U_{37}^{K'}$ semblait indépendant de la salinité, des modifications de la niche écologique ou des changements diagénetiques post-dépôts, palliant ainsi aux principales complications des autres paléomarqueurs océaniques (Cf. Ch. I-4.1). Par la suite, d'autres molécules ont démontré leur potentiel en tant que paléomarqueurs de températures. Citons deux exemples, le TEX₈₆ et les HBI.

1.4.2. Le TEX₈₆

Le TEX₈₆ est un paléothermomètre basé sur la composition de lipides membranaires (tétraéthers isoprénoides glycérol dialkyle glycérol, GDGTs, Fig. I-1) de Crenarchaeota pélagiques marines. Schouten *et al.* (2002) ont constaté que, dans le but de réguler la fluidité des membranes, le nombre de cycles cyclopentaniques de ces lipides membranaires (GDGTs) variait linéairement avec la température (Fig. I-1) selon l'équation suivante :

$$\text{TEX}_{86} = ([\text{IV}] + [\text{V}] + [\text{VI}]) / ([\text{III}] + [\text{IV}] + [\text{V}] + [\text{VI}]) \text{ (Cf. Fig. I-1)}$$

Une calibration effectuée à partir de l'analyse de 32 échantillons de sédiments de surface et de la mesure des températures moyennes annuelles correspondantes, a permis à Wutchter *et al.* (2004) de définir la relation linéaire suivante :

$$\text{TEX}_{86} = 0,015 T + 0,29 \text{ (} r^2=0,92 \text{)}$$

T: représente la température des eaux en degré Celsius.

Les lipides CDGTs ont été détectés dans des sédiments datant de 112 Ma et ont été utilisés pour estimer les paléotempératures dans des sédiments datant du Crétacé (Schouten *et al.*, 2003). Cependant cet outil présente des limites. La structure moléculaire des CDGTs peut être altérée par de hautes températures et de hautes pressions. De plus, ces lipides peuvent être synthétisés à travers toute la colonne d'eau ne permettant pas de définir avec exactitude la température enregistrée. Enfin, peu de laboratoires sont équipés pour mesurer les CDGTs, par conséquent les études utilisant l'indice TEX₈₆ sont encore très limitées.

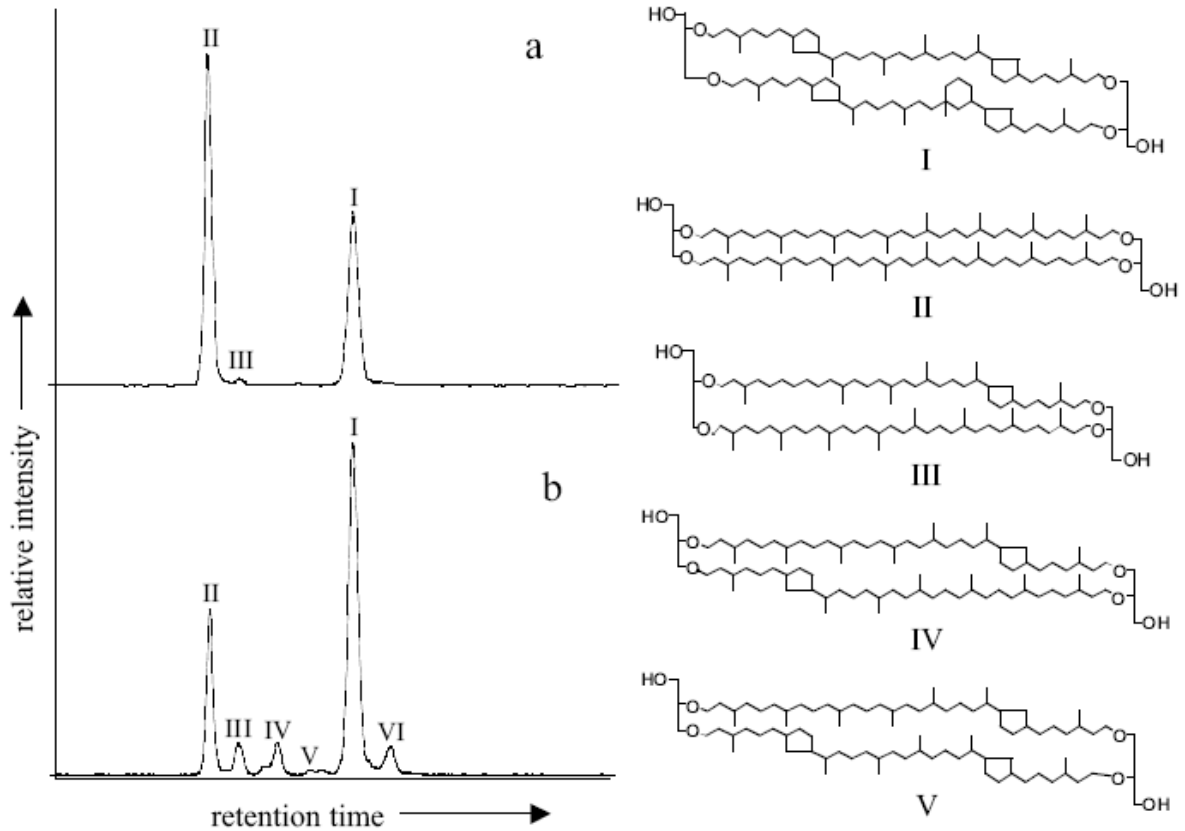


Fig. I-1. Chromatogramme issu de l'analyse en CLHP-SM d'échantillons de (a) la surface du sédiment provenant de la station Halley Bay en Antarctique (b) la surface du sédiment provenant de la mer d'Arabie. Les chiffres romains indiquent la structure des molécules représentées ci-contre (Schouten *et al.*, 2002).

1.4.3. Les HBI

La découverte récente chez des diatomées planctoniques, d'alcènes isoprénoïdes hautement branchés (HBI) dont le nombre d'insaturations varie avec la température, a permis la création d'un nouveau paléomarqueur de température, les HBI (Rowland *et al.*, 2001b). Les alcènes C₂₅ et C₃₀ HBI sont des composés ubiquistes dans les sédiments récents. Ils semblent provenir de 4 genres de diatomées marines (classe des Bacillariophyceae), dénommées *Rhizosolenia* (Volkman *et al.*, 1994; Sinninghe Damste *et al.*, 1999, 2004; Rowland *et al.*, 2001a; Masse *et al.*, 2004), *Haslea* (Volkman *et al.*, 1994; Wraige *et al.*, 1997, 1999; Allard *et al.*, 2001; Sinninghe Damste *et al.*, 2004), *Navicula* (Belt *et al.*, 2001b; Sinninghe Damste *et al.*, 2004) et *Pleurosigma* (Belt *et al.*, 2000, 2001a; Grossi *et al.*, 2004). La structure et la distribution de ces alcènes HBI en C₂₅, nommés haslènes, varient avec les conditions environnementales et en particulier avec la température (Wraige *et al.*, 1997, 1998). En effet, lors d'expériences effectuées *in vitro* sur des cultures d'*Haslea ostrearia*, Rowland *et al.* (2001b) ont démontré

une forte dépendance du taux d'insaturation de ces haslènes avec la température de croissance (Fig. I- 2).

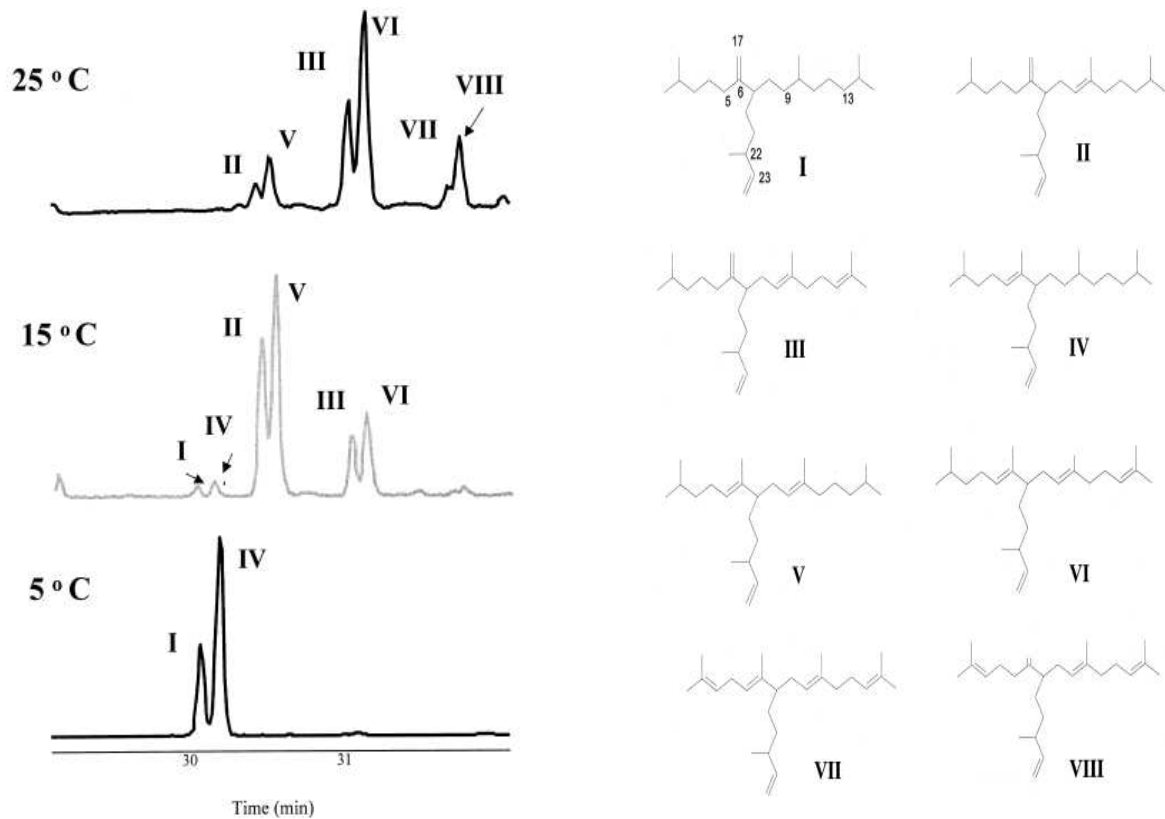


Fig. I-2. Chromatogramme réalisé en CPG-SM illustrant la distribution des haslènes dans des cultures de *H. ostrearia* ayant poussé à 5°C (27 jours), 15°C (7 jours) et 25°C (10 jours). La structure des haslènes est représentée ci-contre (Belt et al., 1994, 1996; Johns et al., 1999; Wraige et al., 1999) (Rowland et al., 2001b).

Bien que ces biomarqueurs n'aient pas encore été appliqués à des reconstructions de paléotempératures, leur utilisation pourrait apporter de précieuses informations, notamment pour les hautes (>25°C) et les basses (<10°C) températures où les alcénones se trouvent en très faibles quantités (déclin du taux de croissance d'*Emiliania huxleyi* à des températures extrêmes) et où les estimations de températures à partir de ce paléothermomètre sont peu précises.

2. Les alcénones

2.1. La découverte des alcénones

La première découverte des alcénones date de 1978. En analysant un extrait lipidique provenant de sédiments de la dorsale de Walvis, au sud ouest de l'Afrique, Boon *et al.* (1978) ont mis en évidence de nouveaux composés présentant des pics de masse à m/z 528, 530, 542, 544, 556 et 558 (Fig. I- 3).

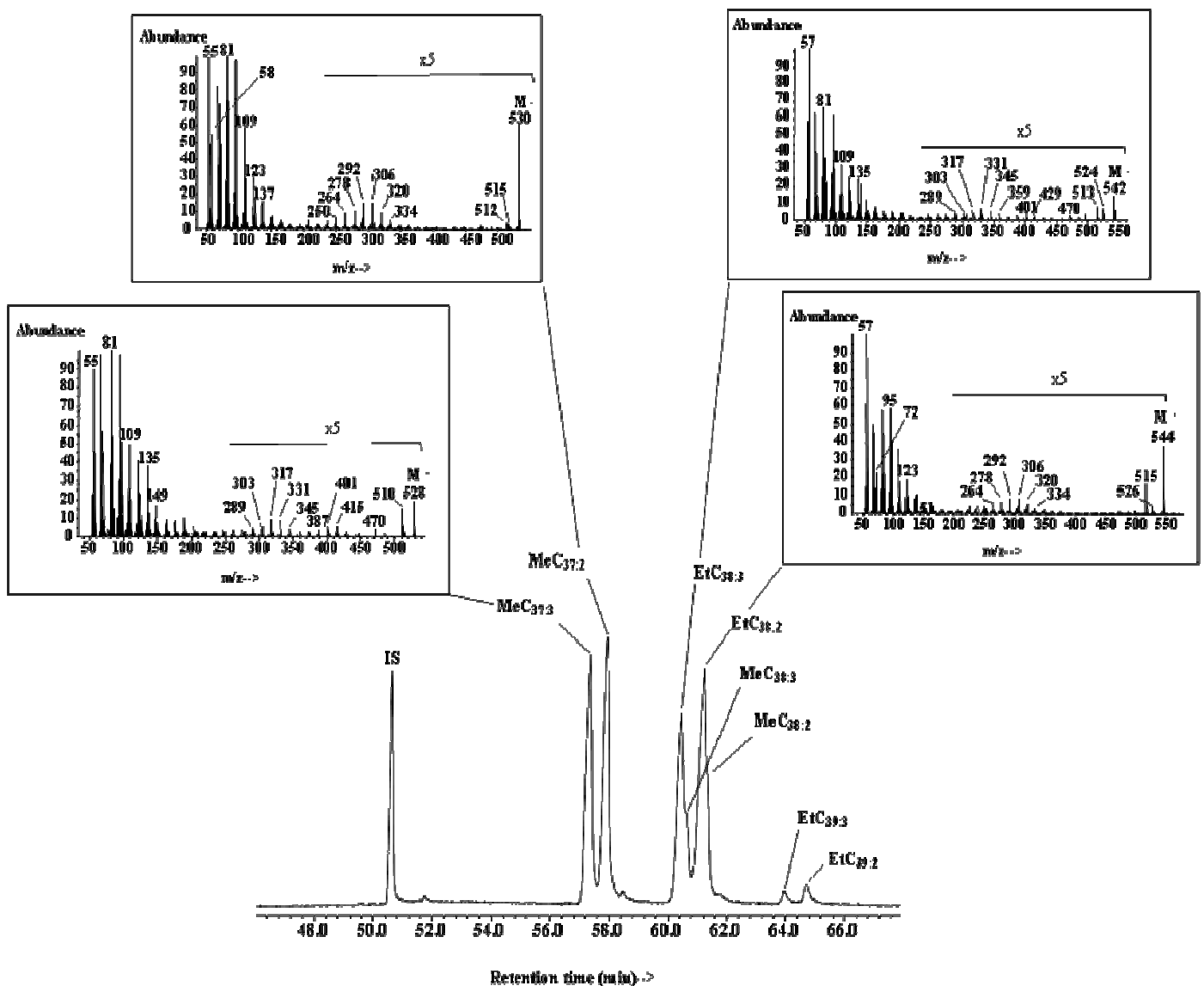


Fig. I-3. Chromatogramme en ion total mettant en évidence les principales alcénones et leurs spectres de masse.

Cette découverte a été confirmée en 1980 par de Leeuw *et al.* (1980), qui ont isolé ces molécules dans des sédiments de la mer Noire et de la fosse de Cariaco et déterminé leurs structures (Fig. I-6). En parallèle, Volkman *et al.* (1980b) ont confirmé leur présence au Japon, en mer du Nord et dans la baie de Walvis. Les études suivantes ont non seulement révélé l'ubiquité de ces molécules dans la plupart des zones océaniques (des régions polaires aux régions subtropicales oligotrophes ; Westbroek *et al.*, 1993), mais aussi dans des environnements inattendus (Cf. tableau I-2) tels que les environnements lacustres (Li *et al.*, 1996; Theissen *et al.*, 2005), hypersalins (Lopez *et al.*, 2005; Rontani & Volkman, 2005), les eaux à basse salinité (la mer Noire, Freeman & Wakeham, 1992) ou les mers fermées (Schulz *et al.*, 2000). La présence des alcénones, dans des sédiments remontant jusqu'au Miocène (≈ 6 Ma ; Marlowe *et al.*, 1984), dans deux bandes argileuses noires ("black shales") provenant du bassin de Bahama (nord-est de l'Atlantique) datant du Crétacé (≈ 105 Ma ; Farrimond *et al.*, 1986) ou encore dans des sédiments de l'est du Pacifique datant du Aptien (120,5 Ma ; Brassell *et al.*, 2004), a démontré le potentiel de conservation à long terme de ces molécules.

2.2. L'origine des alcénones

2.2.1. L'origine des alcénones actuelles

Les alcénones sont produites par un nombre restreint d'espèces appartenant à la classe des Prymnesiophyceae, notamment chez les coccolithophorides de la famille des Gephyrocapsaceae (Volkman *et al.*, 1980a; Marlowe *et al.*, 1984, 1990; Brassell *et al.*, 1986). En milieu océanique, elles sont produites principalement par *Emiliana Huxleyi* et à un degré moindre par *Gephyrocapsa oceanica* (Volkman *et al.*, 1995).

E. huxleyi (Fig. I-4) est le coccolithophore prédominant dans les océans modernes. Cette espèce est cosmopolite, eurytherme et occupe les eaux de surface de la plupart des océans (Okada & Honjo, 1973; Honjo & Okada, 1974). On la retrouve des régions polaires aux régions équatoriales. Elle est présente à de hautes concentrations cellulaires ($5 \cdot 10^3$ cell.l⁻¹) et peut former des blooms intenses à la fois dans les eaux océaniques et côtières (Brown & Yoder, 1994). Elle prend par conséquent une part importante dans le cycle du carbone océanique en tant que producteur primaire, contribuant au stock de matière organique dans les sédiments marins (Marlowe *et al.*, 1984).

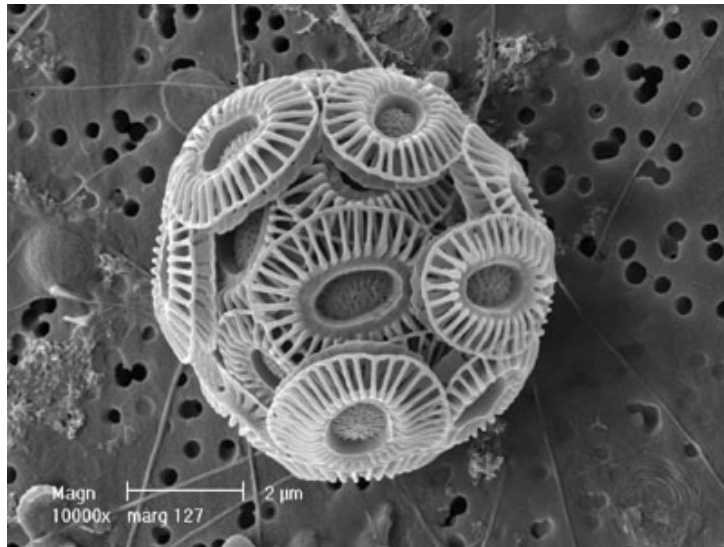


Fig. I-4. Photographie d'une cellule d'*E. huxleyi* observée au microscope électronique à balayage.

G. oceanica (Fig. I-5) est un coccolithophore commun des eaux tropicales à tempérées, cependant, elle forme rarement des blooms monospécifiques. Sa répartition est moins large qu'*E. huxleyi*. Elle prédomine dans les eaux côtières, les mers marginales et intérieures des régions tropicales à subtropicales du Pacifique et de l'océan Indien (Okada & Honjo, 1973; Houghton & Guptha, 1991). Il est courant de la trouver dans des régions frontières à basses latitudes et occasionnellement dans les aires à upwelling. En été, on peut la retrouver à de plus hautes latitudes.

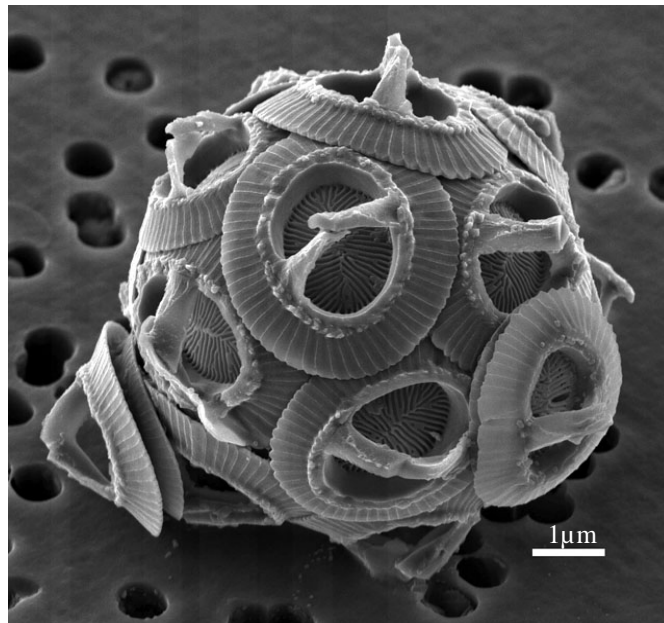


Fig. I-5. Photographie d'une cellule de *G. oceanica* observée au microscope électronique.

Les alcénones ne sont pas uniquement présentes en milieu océanique ouvert. En effet, ces composés ont également été trouvés dans de nombreux lacs et environnements particuliers (tableau I-2).

Tableau I-2. Présence des alcénones dans des environnements particuliers.

Les Environnements limniques	
Lacs	Auteurs, année
Lacs (x5) en Angleterre	Cranwell, 1985
Lacs de l'Antarctique	Volkman <i>et al.</i> , 1988; Jaraula <i>et al.</i> , 2010
Lacs d'eau douce et salins du plateau tibétain	Li <i>et al.</i> , 1996
Lac Van en Turquie	Thiel <i>et al.</i> , 1997
Lacs d'Allemagne, Australie, Russie et U.S	Zink <i>et al.</i> , 2001
Lac Titicaca en Amérique du sud	Theissen <i>et al.</i> , 2005
Lacs de Chine	Sheng <i>et al.</i> , 1999; Sun <i>et al.</i> , 2004; Chu <i>et al.</i> , 2005
Les mers fermées	
Les mers	Auteurs, année
La mer Noire	Freeman & Wakeham, 1992
La mer Baltique	Schulz <i>et al.</i> , 2000
La mer du Nord	Lopez <i>et al.</i> , 2005
Les environnements particuliers	
Environnements	Auteurs, année
les fjords de la Norvège	Ficken & Farrimond, 1995
Les environnements côtiers hypersalins de la mer Méditerranée	Lopez <i>et al.</i> , 2005; Rontani & Volkman, 2005

Dans ces environnements particuliers (lacustres, côtiers, hypersalins, froids), la signature des alcénones dévie significativement de celle attendue pour l'espèce *E. huxleyi* (concentration plus importante de l'alcénone C_{37:4}, présence d'alcénones à courtes chaînes C₃₅-C₃₆ ou mono- et penta-insaturées; Schulz *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Zink *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2007; Jaraula *et al.*, 2010). Cette composition particulière en alcénones s'explique en partie par la contribution d'autres espèces, notamment de l'ordre des Isochrysidales : *Chrysotila* et *Isochrysis* (Marlowe *et al.*, 1984, 1990; Coolen *et al.*, 2004). Citons quelques exemples. Cranwell (1985) et Versteegh *et al.* (2001) ont attribué une proportion importante de l'alcénone en C_{37:4} au genre Chrysophyte (Chrysophyceae). Lors de l'analyse de tapis microbiens côtiers hypersalins, la signature des alcénones observée (absence de méthyle alcénones à chaîne de carbone paire et d'éthyle alcénones à chaîne de carbone impaire (Lopez

& Grimalt, 2004; Lopez *et al.*, 2005; Rontani & Volkman, 2005) s'est révélée être caractéristique de celle identifiée chez *Chrysotila lamellosa* (Marlowe *et al.*, 1984; Rontani *et al.*, 2004; Jaraula *et al.*, 2010). Jaraula *et al.* (2010), ont désigné *Isochrysis* et *C. lamellosa* comme producteurs des alcénones C₃₈-C₄₀ penta-insaturées dans les environnements lacustres à basses températures (ca. 0°C).

Néanmoins, l'identification d'alcénones inhabituelles, non détectées chez les espèces citées ci-dessus, implique l'existence d'autres espèces, non identifiées à ce jour, jouant également un rôle dans la production des alcénones (Conte *et al.*, 1995; Volkman *et al.*, 1995). Citons l'exemple de l'identification des alcénones présentant des doubles liaisons espacées de trois groupements méthylène (Cf. Ch. I-2.3) qui ont été observées en mer Noire et en mer Méditerranée (Rontani *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Rontani & Wakeham, 2008). Bien que la souche *G. oceanica* sp. JB02 soit capable de produire ces alcénones (Rontani *et al.*, 2006c), l'origine de ces alcénones dans l'environnement marin n'est pas encore clairement établie.

2.2.2. L'origine des alcénones à travers les temps géologiques

La dominance d'*E. huxleyi* dans nos océans date de 70 000 à 80 000 ans (Thierstein *et al.*, 1977). La présence des alcénones dans des sédiments plus anciens a été attribuée à d'autres espèces d'haptophytes provenant de la famille des Noelaerhabdaceae (McIntyre, 1970; Marlowe *et al.*, 1990; Volkman *et al.*, 1995; Coolen *et al.*, 2004, 2009).

McIntyre (1970) a suggéré que *E. huxleyi* a évolué à partir du genre *Gephyrocapsa*, peut-être à partir de *G. ericsonii* via *G. protohuxleyi* du fait de la structure très similaire de leurs coccolithes. Marlowe *et al.* (1990) ont comparé la distribution de microfossiles à l'abondance des alcénones dans une grande quantité de carottes sédimentaires. Ils ont en conclu que la présence des alcénones dans les sédiments marins depuis l'Eocène (45 Ma) pourrait être attribuée à la contribution de formes éteintes de la famille des *Gephyrocapsaceae* telles que *Crenalithus*, *Dictyococcites*, *Pseudoemiliana* et *Reticulofenestra*. Coolen *et al.*, (2004) ont déterminé à partir de l'analyse d'ADN ribosomal conservé dans des sédiments anoxiques datant de l'Holocène (dans un lac en Antarctique), 6 nouveaux phylotypes d'espèces productrices d'alcénones proches phylogénétiquement d'*Isochrysis galbana*.

Les différentes études menées afin de déterminer les espèces productrices d'alcénones au cours des temps géologiques sont encore peu nombreuses et incomplètes. Cependant, plusieurs espèces semblent s'être succédées, suggérant que les changements observés dans la

distribution des alcénones au cours des temps géologiques refléteraient plus probablement des changements dans les populations productrices d'alcénones dominantes plutôt qu'une réponse physiologique aux modifications du milieu par une seule espèce. Citons l'exemple du cas de la mer Noire. Bien que *E. huxleyi* semble l'espèce dominante des sédiments les plus récents, l'assemblage de coccolithophores datant de l'Holocène semble bien plus divers (Bukry, 1974). Cette idée est renforcée par deux observations: (i) la première consiste en la transition entre un environnement de faible salinité à forte salinité (Arthur & Dean, 1998) entraînant une modification des espèces dominantes en fonction de leur tolérance à la salinité; (ii) la deuxième réside dans la signature inhabituelle du contenu en alcénones dans les sédiments datant de l'Holocène de la mer Noire, notamment une dominance des alcénones méthyle C_{35:2}, éthyle C_{36:2} et de l'éthyle alcénoate C_{34:2} présentant des doubles liaisons en positions ω15,20 (Xu *et al.*, 2001; Prahl *et al.*, 2006b).

2.3. La structure des alcénones

2.3.1. La structure carbonée des alcénones

Les alcénones sont une classe de cétones linéaires à très longues chaînes carbonées allant de 35 à 41 atomes de carbone, possédant de 1 à 5 doubles liaisons de configuration *trans* (Fig. I-6).

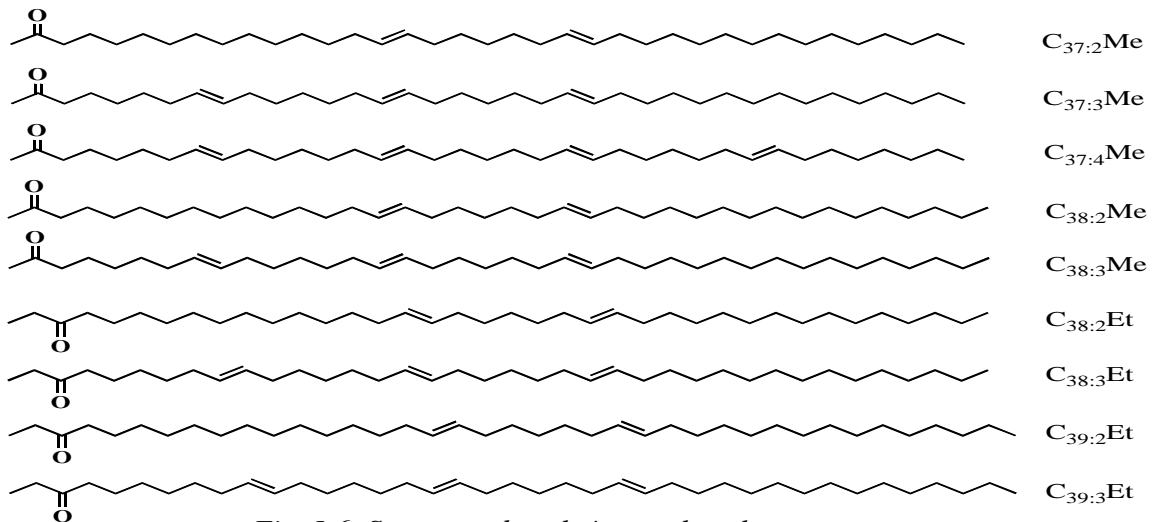


Fig. I-6. Structure des alcénones les plus communes.

Les alcénones les plus abondantes dans les haptophytes et le milieu marin sont les alcénones di et tri-insaturées de condensation en atomes de carbones allant de C₃₇ à C₃₉, bien que des quantités non négligeables d'alcénones en C₃₅, C₃₆, C₄₀ et C₄₁ mono, di-, tri- tétra- et penta-

insaturées aient aussi été reportées (Cranwell, 1985; Volkman *et al.*, 1988; Freeman & Hayes, 1992; Rontani *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Brassell *et al.*, 2004; Prahl *et al.*, 2006b; Rontani & Wakeham, 2008; Jaraula *et al.*, 2010).

Les alcénones possèdent de nombreuses caractéristiques inhabituelles pour des biolipides, qui sont :

- leur longueur de chaîne (C_{35} à C_{41}),
- l'espacement entre leur doubles liaisons (i.e. 5 ou 3 groupements méthylènes alors que la plupart des biolipides en ont un seul ; de Leeuw *et al.*, 1980).
- la configuration de leur double liaison E (*trans*; Rechka & Maxwell, 1988)

Sur la base des travaux initiaux de de Leeuw *et al.* (1980), qui n'avaient formellement identifié que les alcénones en méthyle C_{37} et éthyle C_{38} , la position des doubles liaisons des alcénones a été attribuée en $\omega 8$, $\omega 15$, $\omega 22$ et $\omega 29$. Cependant en 2001, Xu *et al.* ont détecté, dans des sédiments de la mer Noire datant de l'Holocène, une éthyle alcénone en $C_{36:2}$ et une méthyle alcénone en $C_{35:2}$ possédant des doubles liaisons en positions $\omega 15,20$. Des résultats plus récents (Lopez *et al.*, 2005) ont démontré l'existence, dans des tapis microbiens hypersalés, d'alcénones en méthyle C_{38} et éthyle C_{40} , présentant des doubles liaisons en positions $\omega 17$, $\omega 24$ et $\omega 31$. Prahl *et al.* (2006b) ont également observé chez la souche *E. huxleyi* sp. CCMP1742 la présence d'une méthyle alcénone en $C_{36:2}$ dont les doubles liaisons étaient en positions $\omega 16$ et $\omega 23$.

Suite à ces incohérences, Rontani *et al.* (2006c) ont réexaminé la position des doubles liaisons des alcénones di-insaturées de différents haptophytes (*E. huxleyi* sp. CS57, *G. oceanica* sp. JB-02 et *C. lamellosa* sp. HAP17). La détermination de la position des doubles liaisons des alcénones a été déterminée par CPG-SM après dérivatisation à l'aide de tétraoxyde d'osmium et silylation. Ces auteurs ont conclu à l'existence de trois principales familles d'alcénones :

- 1^{ère} catégorie : Les alcénones les plus répandues, di et tri-insaturées dont les doubles liaisons sont séparées de 5 groupements méthylènes et dont la première double liaison est située en position Δ^{14} par rapport au groupement carbonyle.
- 2^{ème} catégorie : Les alcénones à chaîne courte (C_{35} - C_{36}) produites notamment par la souche *E. huxleyi* CCMP1742 (Prahl *et al.*, 2006b) dont les doubles liaisons sont

séparées par 5 groupements méthylènes et dont la première double liaison est située en position Δ^{12} par rapport au groupement carbonyle.

- 3^{ème} catégorie : Les alcénones dont les doubles liaisons sont séparées par trois groupements méthylènes et dont la première double liaison est située en position Δ^{14} par rapport au groupement carbonyle. Ces alcénones ont été détectées en mer Noire dans des sédiments marins datant de l'Holocène (Xu *et al.*, 2001; Prah *et al.*, 2006b), dans du matériel particulaire en suspension et des sédiments de surface (Rontani & Wakeham, 2008), ainsi qu'en mer Ligure et dans la souche *G. oceanica* sp. JB-02 (Rontani *et al.*, 2006c).

Ces résultats ont été confirmés par Lopez et Grimalt (2006) en utilisant une méthode de dérivation différente (formation de cyclopropylimines).

2.3.2. La biosynthèse des alcénones

La diversité dans les structures des molécules d'alcénones suggère des origines biologiques différentes impliquant des processus métaboliques de formation distincts.

Les premières hypothèses concernant la biosynthèse des alcénones ont suggéré une voie de synthèse faisant intervenir un processus de β -oxydation avorté (Volkman *et al.*, 1980a; Marlowe *et al.*, 1984). Cependant une production des alcénones C₃₅-C₄₁ via une β -oxydation avortée semble peu probable. En effet, aucun acide gras de condensation en atomes de carbone supérieure à C₃₆ n'a pu être mis en évidence dans les haptophytes productrices d'alcénones.

L'hypothèse d'une décarboxylation d'un β -cétoacide formé durant l'élongation d'un acide gras reste le scénario le plus probable.

Le mystère est resté entier jusqu'en 2006, où les travaux entrepris par Rontani *et al.* (2006c) ont permis de proposer différentes voies de biosynthèse des alcénones :

- La biosynthèse des alcénones de 1^{ère} catégorie

Les auteurs ont proposé deux voies de synthèse, pouvant expliquer la formation de la structure carbonée des alcénones classiques de condensation en atomes de carbone allant de C₃₇ à C₄₀. Les deux voies font intervenir deux molécules de départ différentes: l'acétyl-SCoA (Fig. I-7) pour l'une et le propionyle-SCoA (Fig. I-8) pour l'autre et impliquent des étapes

successives d'élongation avec le malonyl-SCoA ou le méthylmalonyl-SCoA suivies de réactions de décarboxylation.

- La biosynthèse des alcénones de 2^{ème} catégorie :

Afin d'expliquer l'emplacement inhabituel des doubles liaisons des alcénones di-insaturées à chaînes plus courtes C₃₅ et C₃₆ (Prahl *et al.*, 2006b), Rontani *et al.* (2006) ont suggéré une biosynthèse impliquant une étape supplémentaire de clivage de la chaîne (Voss *et al.*, 1991; Tocher *et al.*, 1998) après la désaturation de l'alkanoyl-ACP en positions $\Delta^{14,21}$ (Fig. I-9 et 10).

- La biosynthèse des alcénones de 3^{ème} catégorie :

Enfin, la formation des alcénones présentant un espacement inhabituel de trois groupements méthylènes entre leurs doubles liaisons, proviendrait de la désaturation en position Δ^{14} et Δ^{19} (distance par rapport au groupe carbonyle) de l'alkanoyl-ACP résultant de l'élongation-décarboxylation préalable (Fig. I-8). Sur la base de la position Δ^{19} d'une de leurs doubles liaisons, qui correspond à celle des alcénones mono-insaturées (méthyle C_{37:1}; éthyle C_{37:1}, C_{38:1}; méthyle C_{35:1} et éthyle C_{36:1}) précédemment détectées dans plusieurs haptophytes (Rontani *et al.*, 2001), Rontani *et al.* (2006c) ont conclu en l'existence d'un lien biosynthétique entre ces composés (Fig. I- 10). Cette hypothèse s'appuie sur la présence de l'éthyle alcénone C_{36:1} (Δ^{19}) dans les échantillons sédimentaires de mer Noire dominés par l'éthyle alcénone C_{36:2} ($\Delta^{14,19}$) (Xu *et al.*, 2001).

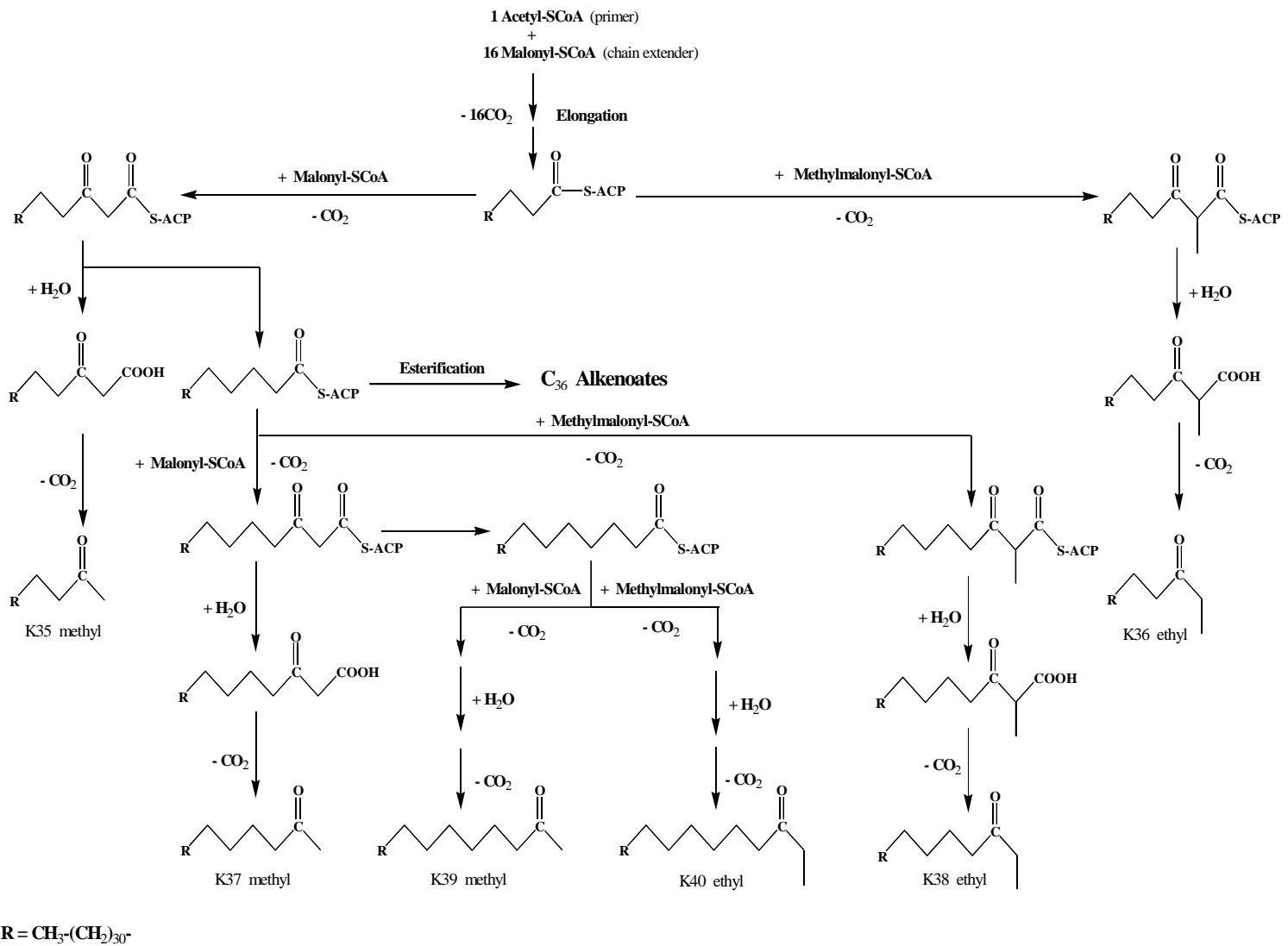


Fig. I-7. Voie biosynthétique de la chaîne carbonée des molécules d'alcénones à partir du primer acetyl-S-CoA (Proposée par Rontani et al., 2006c).

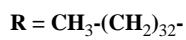
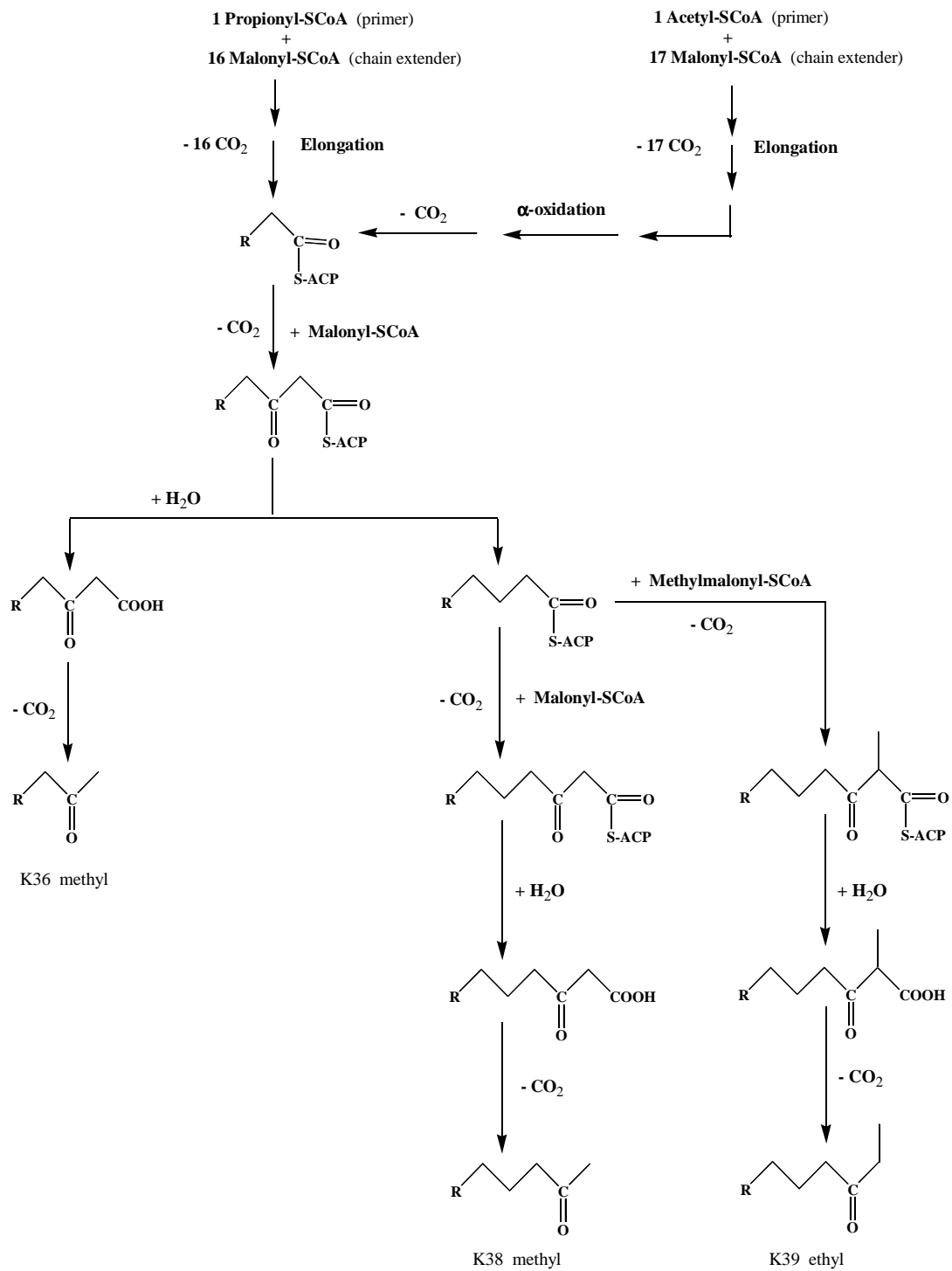


Fig. I-8. Voie biosynthétique de la chaîne carbonée des molécules d'alcénones à partir du primer propionyle-ScoA (Rontani et al., 2006c).

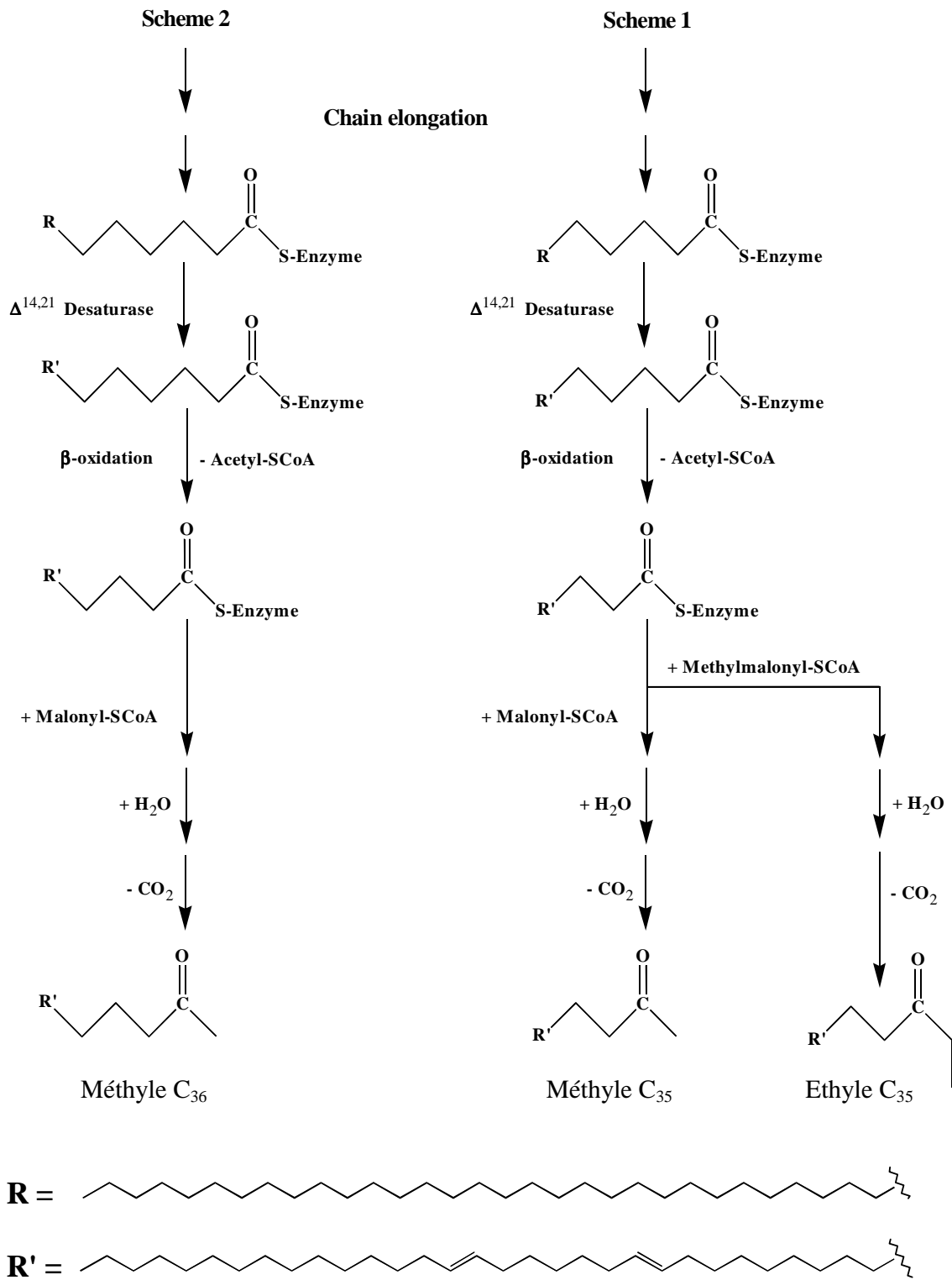


Fig. I-9. Voie biosynthétique de la formation des alcénones à courtes chaînes carbonées produites par la souche d'*E. huxelyi* sp. CCMP1742 (Rontani et al., 2006c).

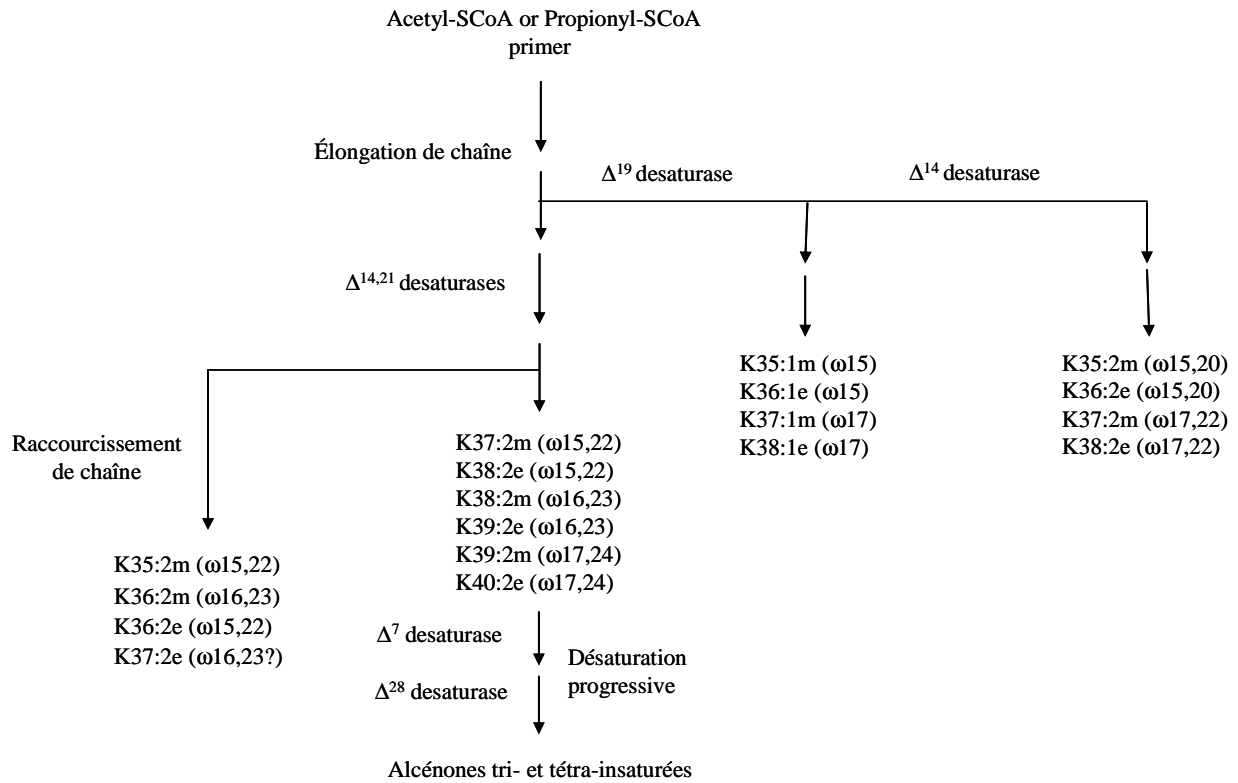


Fig. I-10. Voie de désaturation proposée pour la chaîne carbonée des différentes familles d'alcénones (Rontani et al., 2006c).

2.4. Leur rôle

A ce jour, le rôle des alcénones reste encore mal connu. Les premières hypothèses émises par Brassell *et al.* (1986) et Prahll *et al.* (1988) ont permis de localiser les alcénones dans les membranes cytoplasmiques suggérant que ces dernières auraient un rôle de régulateur de la rigidité et de la fluidité de la membrane. Cependant, la configuration *trans* des doubles liaisons des alcénones qui tranche avec celle des doubles liaisons des lipides membranaires qui est généralement *cis* (Rechka & Maxwell, 1988) suggérait un rôle physiologique plutôt que biochimique des alcénones. La localisation des alcénones dans les membranes cellulaires a par la suite été remise en question par Conte et Eglinton (1993).

En 2001, Epstein *et al.*, ont émis une autre hypothèse. Se basant sur l'évolution de la concentration en alcénones au cours des différentes phases de croissance d'*E. huxleyi* (augmentation de la proportion des alcénones en C₃₇ en phase stationnaire), et lors d'incubation obscures (diminution nette de la concentration en alcénones en C₃₇ par cellule

d'*E. huxleyi*), les auteurs ont attribué aux alcénones un rôle de stockage dans le métabolisme du phytoplancton.

Un peu plus tard, Sawada et Shiraiwa (2004), ont isolé des fractions membranaires d'*E. huxleyi* et ont observé une association des alcénones aux organites internes tels que le réticulum endoplasmique et le compartiment de production des coccolithes. Les auteurs ont alors proposé une nouvelle hypothèse selon laquelle les alcénones joueraient un rôle dans la formation des coccolithes et leur contrôle dans la flottabilité des cellules alourdies par le port de coccolithes. Cependant cette hypothèse semble peu concluante du fait que le contenu intracellulaire en alcénones est similaire chez les individus d'*E. huxleyi* calcifiés ou non calcifiés (Fernandez *et al.*, 1994).

L'hypothèse la plus probable reste donc celle selon laquelle les alcénones joueraient un rôle de stockage d'énergie (Epstein *et al.*, 2001). Celle-ci a été confirmée par plusieurs études qui ont montré qu'une carence nutritive ou une limitation de lumière, conduit à une variation de la concentration en alcénones (Epstein *et al.*, 1998, 2001; Versteegh *et al.*, 2001; Prahel *et al.*, 2003, 2006a). Plus récemment, les travaux entrepris par Eltgroth *et al.* (2005) ont localisé les alcénones dans des vésicules cytoplasmiques qui deviennent plus nombreuses lors de carences alimentaires et disparaissent à l'obscurité. De plus, les alcénones se trouvent en grandes quantités dans les chloroplastes. De ce fait, ces auteurs ont suggéré que les alcénones seraient fabriquées dans les chloroplastes et seraient ensuite exportées dans des vésicules cytoplasmiques (Fig. I-11) afin d'être stockées ou utilisées pour le métabolisme du phytoplancton.

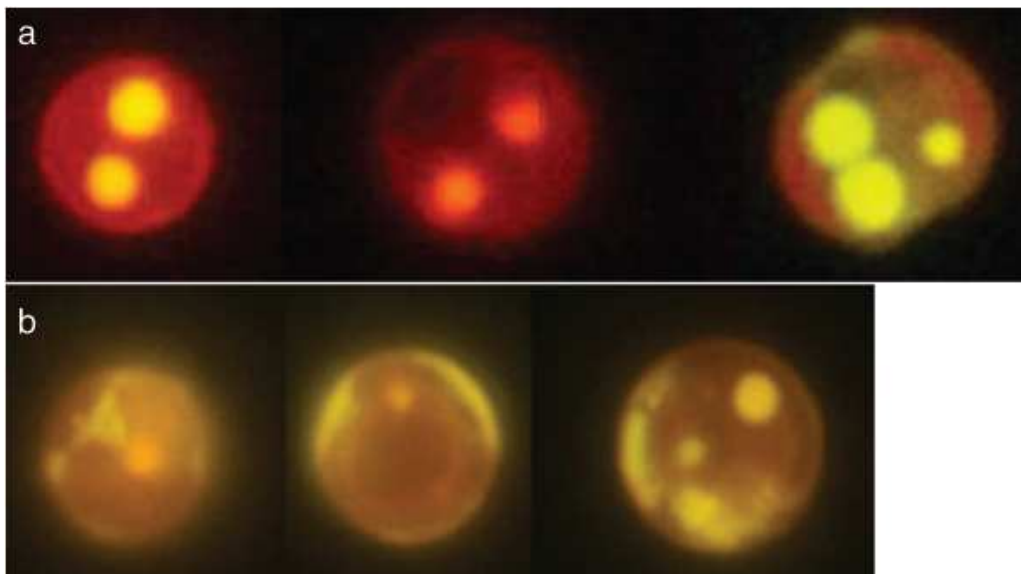


Fig. I-11. Mise en évidence au microscope à épifluorescence de la présence d'inclusions riches en alcénones dans le cytoplasme d'*Isochrysis galbana* (a) et d'*Emiliana. huxleyi* (b) (Eltgroth *et al.*, 2005).

2.5. Les différentes méthodes analytiques utilisées pour quantifier les alcénones dans des échantillons naturels

Les quantités d'alcénones en C_{37} présentes dans les sédiments marins varient entre 100 ppb et 10 ppm (Herbert, 2003). Après extraction de sédiments ou de matériel particulaire à l'aide de solvants organiques, ces composés se retrouvent dans l'extrait lipidique total. Certains laboratoires analysent les alcénones directement dans cet extrait, alors que d'autres préfèrent effectuer différentes étapes de purification (saponification, séparation sur colonne de silice ou sur couche mince, adduction à l'urée, etc.) avant l'analyse. En général, les échantillons provenant de zones océaniques ouvertes ne contiennent pas de quantités significatives de composés pouvant interférer avec les alcénones en C_{37} lors de l'analyse (esters lourds, éthers de stérols, etc.). Cependant, pour certains échantillons, l'utilisation de plusieurs étapes de purification est apparue nécessaire. En fait, la purification requise lors de l'analyse des extraits contenant les alcénones dépend surtout de la technique utilisée lors de la quantification. Comme nous allons le voir par la suite, certaines techniques "aveugles" comme la CPG-FID nécessitent des purifications poussées afin d'éviter de possibles co-élutions des alcénones avec d'autres composés (e.g. esters lourds, éthers de stérols, etc.). D'autres techniques plus sélectives (CPG-SM en mode d'ionisation positif, Fast CPG-SM en temps de vol, CPG-SM des alcénones réduites en mode SIM) peuvent être appliquées sur des extraits lipidiques totaux non purifiés sans problème.

2.5.1. Analyses en chromatographie en phase gazeuse détection en ionisation de flamme (CPG-FID)

Les premières méthodes d'analyse des extraits lipidiques s'appuyaient sur l'utilisation de la CPG-FID. Elle permet la séparation des composés organiques d'un mélange complexe en fonction de leur nature et de leur taille. La détection par ionisation de flamme est basée sur la mesure du courant créé par les ions formés lors de la combustion des composés analysés dans une flamme. Cette méthode a vite montré certaines limites :

- Elle nécessite une concentration minimale de 50 ng/g d'alcénones au-dessous de laquelle des erreurs significatives sont observées dans les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (une déviation de l'ordre de $+0,5^{\circ}C$ a été observée quand la somme totale des alcénones se situait en dessous des 5-10 ng ; (Villanueva & Grimalt, 1997).

- Afin de permettre une bonne séparation des alcénones, les temps d'analyse employés sont relativement longs. Il est intéressant de noter toutefois que la technique de "fast" CPG-FID qui se développe actuellement et qui implique l'utilisation de colonnes très courtes et de faibles diamètres devrait permettre de réduire considérablement la durée d'analyse des alcénones.
- C'est une technique aveugle ne permettant pas de visualiser ce qui est quantifié. L'identification des alcénones n'est basée que sur la comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux de standards. Des problèmes de co-élution des alcénones avec d'autres composés présents dans les extraits lipidiques ne peuvent être mis en évidence par cette technique (Villanueva & Grimalt, 1996).
- Dans certaines conditions chromatographiques, une co-élution entre le méthyle alcénoate en C_{36:2} et l'alcénone en C_{37:2} est souvent observée. Ce problème peut toutefois être résolu en utilisant une colonne capillaire fine (ca. 0,1 µm) à 100% de diméthylsiloxane ou de 60 m de longueur.

2.5.2. Analyses en chromatographie en phase gazeuse détection en ionisation de flamme (CPG-FID) bidimensionnelle

Certains auteurs ont appliqué une technique de CPG-FID bidimensionnelle à l'analyse des alcénones (Xu *et al.*, 2001). Cette technique, tout en gardant les avantages et les inconvénients de la CPG-FID classique, permet toutefois une meilleure discrimination entre les alcénones et les composés pouvant potentiellement interférer avec elles.

2.5.3. Analyses à l'aide d'un couplage chromatographie en phase gazeuse - spectromètre de masse travaillant en impact électronique (CPG-SMEI)

Cette méthode permet d'identifier les composés à analyser sur la base de leur pic moléculaire et de leurs fragmentations spécifiques. Elle présente donc l'avantage (par rapport à la CPG-FID) de pouvoir mettre en évidence d'éventuelles co-élutions des alcénones avec d'autres composés et permet d'être sûr de quantifier uniquement les composés d'intérêts. Malheureusement, du fait de leur structure, les alcénones se fragmentent fortement en impact électronique et produisent des spectres de masse très proches de ceux des alcènes correspondants. Ces spectres de masse ne présentent pas de fragments suffisamment spécifiques et intenses pour pouvoir être utilisés en mode SIM (Selected Ion Monitoring). Ce

mode d'analyse (SIM), qui consiste à n'enregistrer que certains ions d'intérêts, présente l'avantage d'accroître considérablement la sensibilité de l'appareil et permet de quantifier des composés présents à l'état de traces dans des mélanges complexes. Du fait de l'impossibilité d'analyser les alcénones en mode SIM, l'analyse de ces composés en CPG-SMEI est généralement assez peu sensible.

2.5.4. Analyses à l'aide d'un couplage chromatographie en phase gazeuse-spectromètre de masse travaillant en ionisation chimique positive (CPG-SMICP)

Rosell-Melé *et al.* (1995a) ont proposé une méthode d'analyse des alcénones faisant intervenir un couplage chromatographie en phase gazeuse-spectromètre de masse travaillant en ionisation chimique positive (CPG-SMICP). Cette technique, qui utilise l'ammoniac comme gaz réactant, permet (grâce à la formation d'ions pseudo-moléculaires à $[M + NH_4]^+$) la caractérisation et la quantification des alcénones dans les sédiments marins (Rosell-Melé *et al.*, 1995a). Cette technique s'est révélée être plus sélective et plus sensible que la CPG-FID. Cette méthode présente toutefois une limite importante, à savoir sa faible reproductibilité. De plus, des incohérences dans les mesures de l'indice $U_{37}^{K'}$ (Cf. Ch. I-3.1) qui résultent d'une non-linéarité des facteurs de réponse des alcénones di- et tri-insaturées ont pu être observées (Chaler *et al.*, 2003). Par conséquent, l'utilisation de cette technique nécessite une calibration préalable de l'instrument avec des standards de compositions connues en alcénones C_{37} afin de minimiser les effets de cette absence de linéarité.

2.5.5. Analyses par CPG-SMEI après réduction et silylation

Une méthode alternative a été développée par Rontani *et al.* (2001). Cette méthode consiste en une réduction préalable (avec du $NaBH_4$) des alcénones en alcénols correspondants, suivie d'une silylation. Bien que cette méthode nécessite une étape de traitement supplémentaire des échantillons, les alcénols silylés sont mieux séparés chromatographiquement que les alcénones et présentent de meilleurs facteurs de réponses en CPG-SMEI.

Les calculs de l' $U_{37}^{K'}$ effectués à partir des alcénols silylés dans différentes cultures d'haptophytes (*E. huxleyi*, *G. océanica* et *I. Galbana*) et dans des échantillons sédimentaires ont fourni des résultats similaires aux valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ calculées à partir des alcénones d'origine, aux erreurs expérimentales près ($\pm 0,01$ units).

De plus les spectres des alcénols silylés sont dominés par des ions très intenses à m/z 117 (dans le cas des méthyles alcénols silylés) et à m/z 131 (dans le cas des éthyles alcénols silylés), résultant du clivage en α du groupement triméthylsilyle éther (Fig. I-12). Ces ions sont suffisamment intenses et sélectifs pour pouvoir être utilisés lors d'analyses en mode SIM (Selected Ion monitoring). Ceci a permis de diminuer considérablement la limite de détection des alcénones en CPG-SMEI.

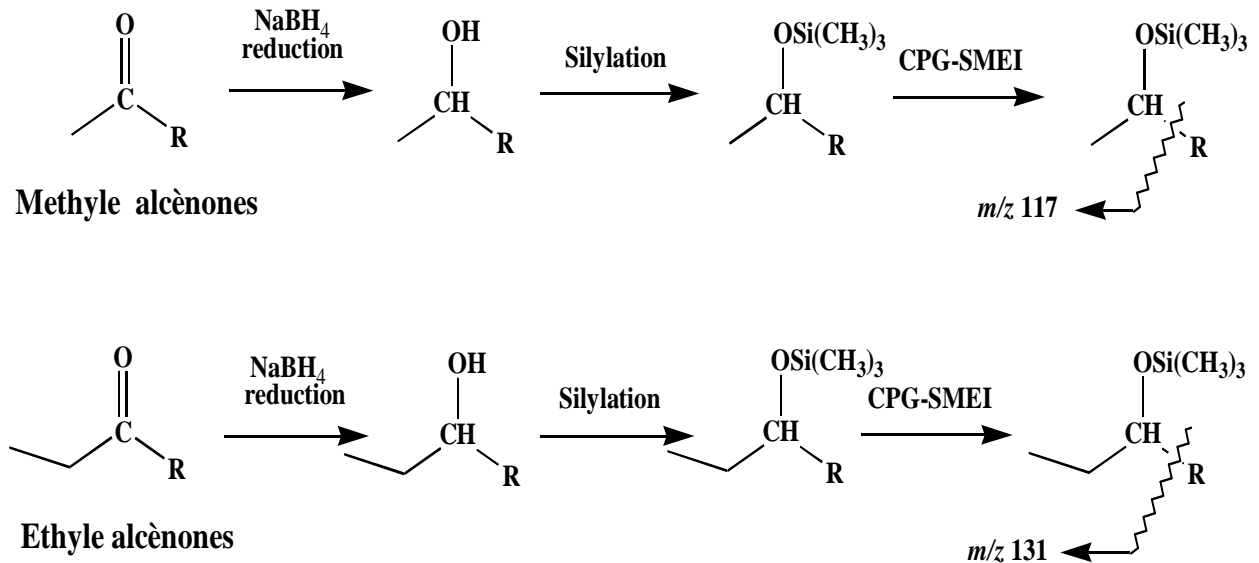


Fig. I-12. Formation et analyse des alcénols silylés.

Par cette méthode de mise en œuvre très simple et ne nécessitant pas d'appareillage particulier (un simple couplage CPG-SMEI), il est possible de quantifier des traces d'alcénones dans des mélanges très complexes. Un exemple d'application est donné dans la figure I-13.

Grâce à cette méthode, de nouvelles alcénones, présentes en faibles quantités dans différents haptophytes ont pu être mises en évidence: (i) des alcénones en méthyle $C_{35:1}$ et $C_{37:1}$ et éthyle $C_{36:1}$ et $C_{38:1}$ chez *E. huxleyi* (ii) des alcénones en méthyle $C_{35:1}$; $C_{35:2}$; $C_{36:2}$; $C_{37:1}$ et éthyle $C_{36:1}$; $C_{36:2}$; $C_{38:1}$ chez *G. océanica* (iii) et enfin des alcénones en méthyle $C_{35:1}$; $C_{35:2}$; $C_{37:1}$ chez *I. galbana* (Rontani *et al.*, 2001). On peut noter que la spécificité des ions utilisés lors des analyses en SIM peut encore être améliorée en effectuant la réduction avec du $NaBD_4$ à la place du $NaBH_4$. Dans ce cas les ions d'intérêt seront observés à m/z 118 et m/z 132.

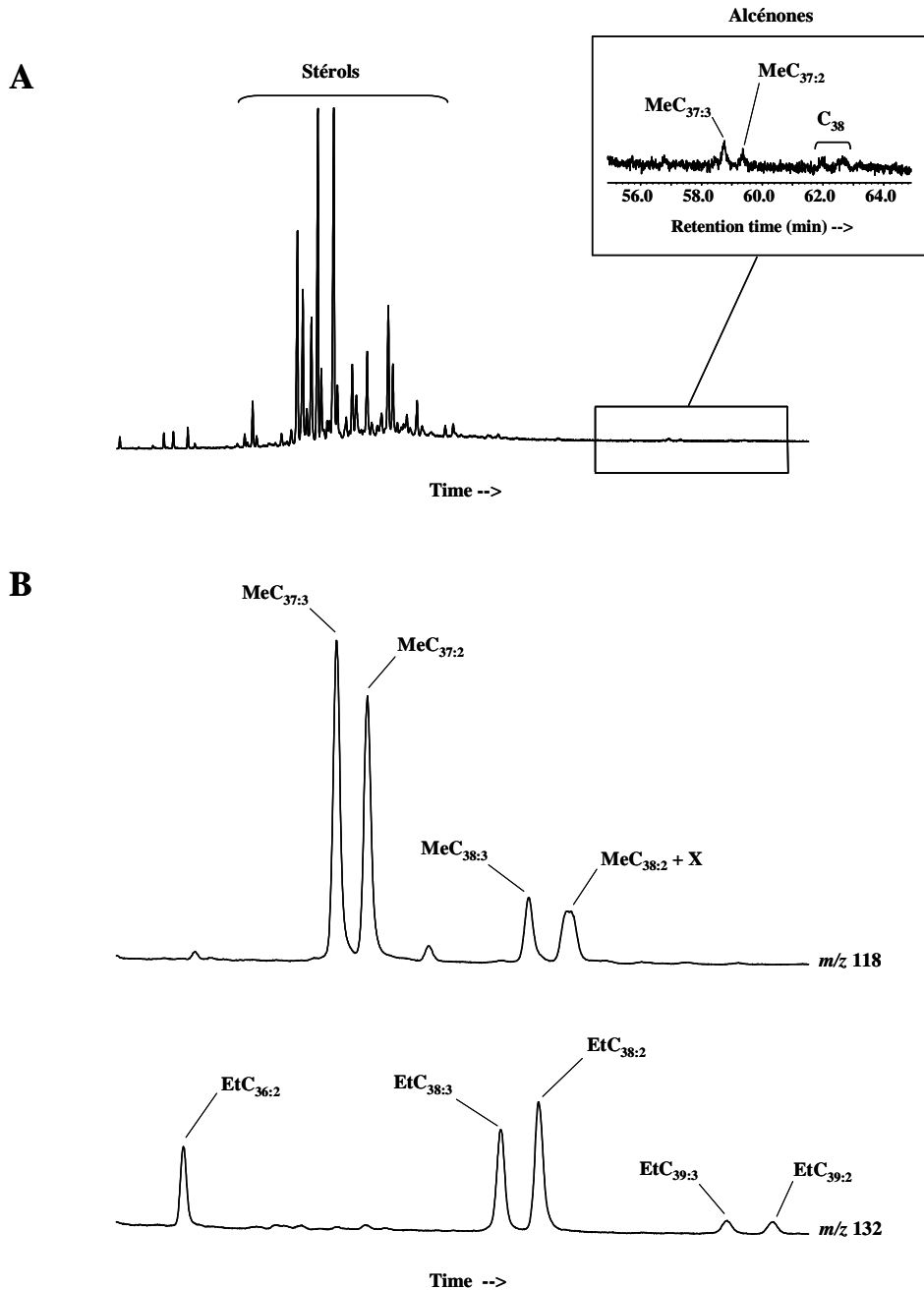


Fig. I-13. Analyses par CPG-SMEI (avant et après réduction-silylation) du contenu en alcénones d'un extrait lipidique obtenu à partir d'un échantillon de matériel particulaire prélevé par trappe à la station DYFAMED.

2.5.6. Analyses en Fast CPG-SM en temps de vol

Récemment, Hefter (2008) a proposé d'analyser les alcénones à l'aide d'un couplage fast CPG-SM fonctionnant en temps de vol. Cette technique permet de réduire pratiquement par 10 le temps d'analyse (comparativement aux analyses classiques en CPG-FID). Toutefois des incohérences ont été observées entre les valeurs de l'indice $U_{37}^{K'}$ (Cf. Ch. I-3.1) obtenues par cette technique et par CPG-FID. Ces incohérences proviennent des facteurs de réponses des

alcénones di- et tri-insaturées qui sont bien distincts en temps de vol. Une calibration préalable de l'appareil avec des standards d'alcénones en C_{37:2} et C_{37:3} est donc nécessaire afin de quantifier correctement ces composés dans des échantillons naturels. Bien que très sensible cet appareillage est malheureusement beaucoup trop onéreux pour pouvoir être utilisé de manière routinière par la plupart des laboratoires travaillant sur les alcénones.

3. Les alcénones, un outil paléoclimatique

3.1. Les alcénones, paléomarqueurs des températures des eaux de surface

Lors d'expérimentation *in vitro* sur des cultures d'*E. Huxleyi* et *Isochrysis Galbana*, une relation linéaire entre la température de croissance de la culture et le taux d'insaturation des alcénones (en particulier des alcénones à 37 atomes de carbone) produites par les haptophytes a été mise en évidence (Marlowe, 1984; Prahl & Wakeham, 1987; Prahl *et al.*, 1988). Cette première approche consistait à placer les cultures d'haptophytes productrices d'alcénones à différentes températures de croissance et de mesurer le taux d'insaturation des alcénones à une température donnée. Les résultats ont démontré que la proportion des alcénones C₃₇ di et tri-insaturées, variait linéairement avec la température (Fig. I-14). En effet, une diminution de la température mène à une augmentation du degré d'insaturation des alcénones (Fig. I-14) et inversement.

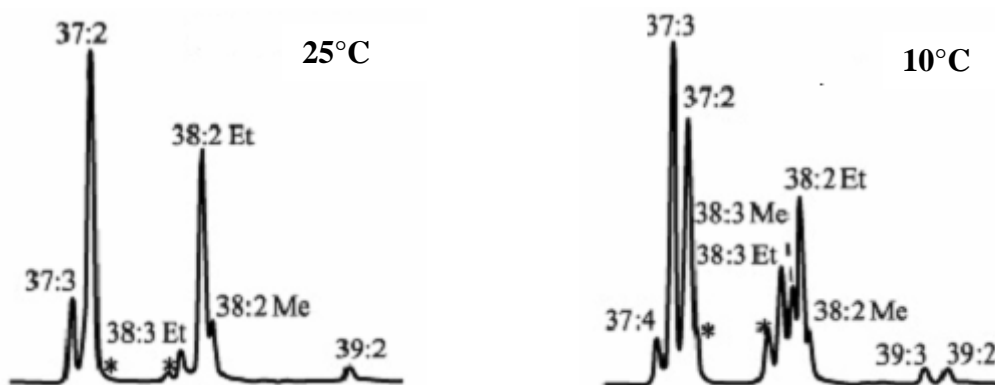


Fig. I-14. Chromatogramme montrant la distribution des alcénones présentes dans des cultures d'*E. huxleyi* maintenues à 25°C et 10°C (Prahl & Wakeham, 1987).

A partir de cette observation et de l'ubiquité des alcénones à la fois dans les sédiments marins anciens et récents, Brassell *et al.* (1986) ont proposé un indice nommé U_{37}^K permettant de déterminer la température à la surface des eaux en fonction du taux d'insaturation des alcénones produites par les haptophytes unicellulaires à un moment donné, grâce au rapport :

$$U_{37}^K = [C_{37:2}] - [C_{37:4}] / [C_{37:2} + C_{37:3} + C_{37:4}]$$

[C_{37:x}] représente la concentration de l'alcénone à 37 atomes de carbone et x le nombre de double liaison.

Ces auteurs ont observé une bonne corrélation entre la variation des teneurs en isotope de l'oxygène (calculé à partir de trois espèces de foraminifères) et celle du taux d'insaturation des alcénones (U_{37}^K), durant les périodes glaciaires et interglaciaires de ces 120 000 dernières années (Fig. I-15). A partir de ce constat, les auteurs ont suggéré que ces composés avaient la capacité d'enregistrer les variations des températures des eaux de surfaces (SSTs : Sea Surface Temperature) passées (Brassell *et al.*, 1986).

La rareté de l'alcénone en C_{37:4} dans de nombreux sédiments marins a conduit Prahl et Wakeham (1987), à simplifier ce rapport et à le remplacer par l'indice :

$$U_{37}^{K'} = [C_{37:2}] / ([C_{37:2}] + [C_{37:3}])$$

En effet l'alcénone en C_{37:4} ne semble présente en quantité suffisante que dans les sédiments marins des hautes latitudes (Rosell-Melé *et al.*, 1994; Sikes *et al.*, 1997; Rosell-Melé, 1998; Sicre *et al.*, 2002) et dans les lacs et les sédiments d'eau douce (Li *et al.*, 1996; Thiel *et al.*, 1997). De plus, la comparaison des valeurs obtenues à partir de ce nouvel indice ($U_{37}^{K'}$) avec celles obtenues de l'indice (U_{37}^K) montre une meilleure linéarité de l' $U_{37}^{K'}$ pour les basses températures (Prahl *et al.*, 1988; Sikes *et al.*, 1997). Propos renforcés par les travaux de Freeman et Wakeham (1992) qui suggèrent que l'alcénone C_{37:4} serait dégradée plus rapidement que ses homologues moins insaturés. Par conséquent, l'indice $U_{37}^{K'}$ serait moins sensible aux processus diagénétiques et donc plus approprié aux études paléocéanographiques.

La corrélation entre les paléotempératures dérivées de l' $U_{37}^{K'}$ et les autres proxies a été confirmée par la suite par différents auteurs (Cf. tableau I-9).

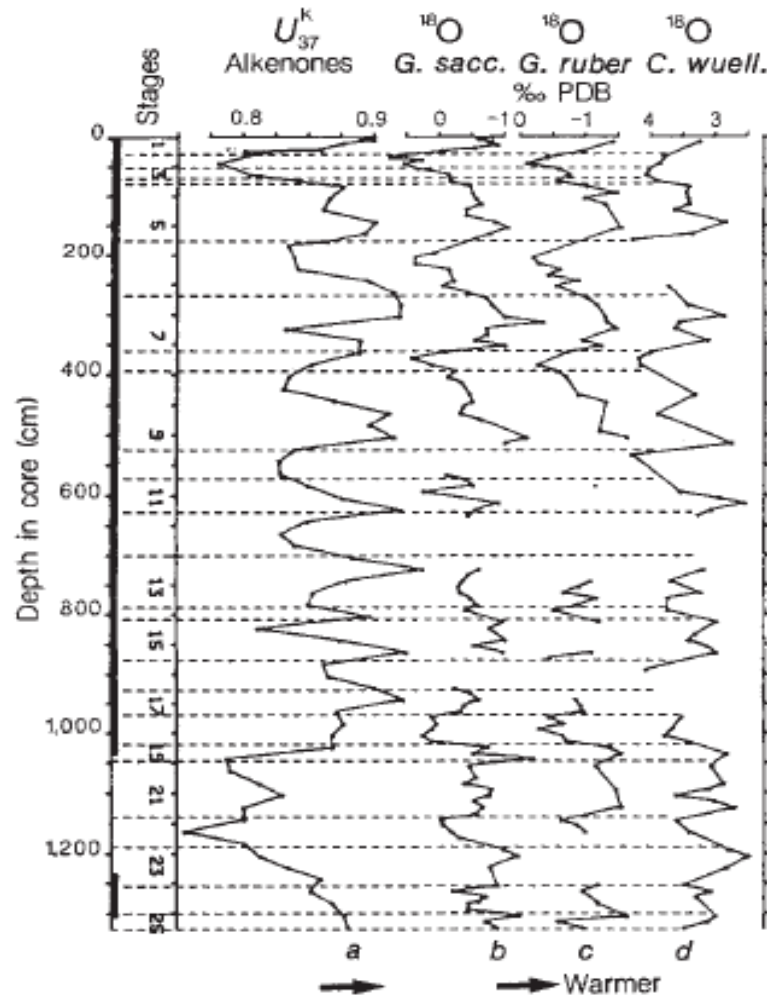


Fig. I-15. Courbes stratigraphiques obtenues à partir d'échantillons de carottes sédimentaires provenant de l'est de l'Atlantique équatorial, de (a) l'indice d'insaturation des alcénones (U_{37}^K) et des valeurs de $\delta^{18}O$ des foraminifères (b) *G. sacculifer* (c) *G. rubens* et (d) *C. Wuellerstorfi* durant ces 120 000 dernières années (Brassell et al., 1986).

3.2. Les différentes calibrations

3.2.1. Les différentes approches de calibrations

Grâce à des mesures expérimentales à partir de cultures d'*E. huxleyi* (provenant du nord-est du Pacifique), une régression linéaire, permettant de convertir le ratio $U_{37}^{K'}$ en SST, a été définie comme suit :

$$U_{37}^{K'} = 0,033 T + 0,043, r = 0,997 \text{ (Prah} \& \text{ Wakeham, 1987).}$$

T : représente la température moyenne des eaux de surface en degré Celsius.

Afin de valider l'applicabilité de cette calibration en conditions naturelles, les auteurs ont mesuré l' $U_{37}^{K'}$ dans des échantillons de particules en suspension et de sédiments provenant de diverses zones géographiques du Pacifique (Cariaco Trench, Pérou, Vertex, etc.). Une bonne corrélation entre les données obtenues en laboratoire et *in situ* ont permis de conclure que *E. huxleyi* était soit l'espèce dominante, soit une espèce représentative des haptophytes capables de biosynthétiser les alcénones, celles-ci ayant la même réponse aux variations de températures de croissance. Cette calibration permet donc à partir de l'indice $U_{37}^{K'}$ de déterminer la moyenne des températures annuelles des eaux de surface (SSTs) présentes et passées dans les eaux allant de 8°C à 25°C.

La calibration de Prah et Wakeham (1987) a été affinée par la suite par Prah *et al.* (1988) en :

$$U_{37}^{K'} = 0,034T + 0,039$$

Cette dernière relation est devenue la calibration standard pour convertir les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ en températures*.

Suite à ces travaux préliminaires, les études ont consisté à vérifier la robustesse de cette calibration en comparant les valeurs obtenues avec l' $U_{37}^{K'}$ et les SSTs mesurées *in situ* (ou la température de culture *in vitro*). Trois approches ont été utilisées : (i) à partir de cultures expérimentales en laboratoire de diverses haptophytes productrices d'alcénones (tableau I-3), (ii) à partir de l'analyse d'échantillons de matière organique particulaire dans diverses zones géographiques (tableau I-4), (iii) à partir de l'analyse d'échantillons de sédiments de surface ou de carottes sédimentaires dans diverses zones géographiques (tableau I-5).

En 1998, Müller *et al.* ont établi une calibration du sud-est de l'Atlantique ($U_{37}^{K'} = 0,033T + 0,069$, $r^2=0,981$) à partir de l'étude de 149 échantillons sédimentaires recouvrant une zone géographique tropicale à subtropicale pour des eaux de surface allant de 0° à 27°C (tableau I-5). La meilleure corrélation linéaire entre l' $U_{37}^{K'}$ et les SST a été obtenue avec les températures moyennes annuelles des eaux de surface (maSSTs) de 0 à 10 m (par comparaison avec des températures moyennes saisonnières, annuelles et en fonction de la production de coccolithes) suggérant que le ratio $U_{37}^{K'}$ refléterait les températures de la couche de mélange et serait indépendant des variations saisonnières et de la production primaire.

* Dans ce manuscrit, les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ seront converties en température à partir de cette calibration sauf mention du contraire

Tableau I-3. Différentes calibrations établies à partir d'expérimentations en laboratoire (incubations de cultures d'*E. huxleyi*, *G. oceanica*, *I. galbana* et *C. lamellosa*).

<u>Espèces concernées</u>	<u>Equations</u> (T en °C)	<u>Auteurs</u>
<i>E. huxleyi</i> (souche 55a)	$U_{37}^{K'} = 0,033 T + 0,043$ (r ² =0,994)	Prahl & Wakeham, 1987
<i>E. huxleyi</i> (souche 55a)	$U_{37}^{K'} = 0,034 T + 0,039$ (r ² = 0,994)	Prahl <i>et al.</i> , 1988
<i>E. huxleyi</i>	$U_{37}^{K'} = 0,037 T - 0,282$ (r ² =0,764)	Brassell, 1993
<i>I. galabana</i>	$U_{37}^{K'} = 0,052 T - 1,120$ (r ² =0,791)	Brassell, 1993
<i>G. oceanica</i> (souche JB-02)	$U_{37}^{K'} = 0,049 T - 0,520$ (r ² =0,890)	Volkman <i>et al.</i> , 1995
<i>E. huxleyi</i> (souche EH2)	$U_{37}^{K'} = 0,063T - 0,762$ (r ² =0,943)	Sawada <i>et al.</i> , 1996
<i>G. oceanica</i> (souche G01)	$U_{37}^{K'} = 0,044 T - 0,204$ (r ² =0,951)	Sawada <i>et al.</i> , 1996
<i>E. huxleyi</i> (souche S. Africa)	$U_{37}^{K'} = -0,224 + 0,044 T$ (r ² =0,97)	Conte <i>et al.</i> , 1998
<i>E. huxleyi</i> (souche B92/21)	$U_{37}^{K'} = -0,104 + 0,033 T$ (r ² =0,97)	
<i>E. huxleyi</i> (souche G1779Ga)	$U_{37}^{K'} = - 0,453 + 0,052 T$ (r ² = 0,99)	
<i>G.oceanica</i> (souche AB1)	$U_{37}^{K'} = - 0,453 + 0,056 T$ (r ² =0,98)	
<i>E. huxleyi</i> (souche M181)	$U_{37}^{K'} = - 0,773 + 0,071 T$ (r ² =1)	
<i>E. huxelyi</i> (souche Van 556)	$U_{37}^{K'} = 0,014 + 0,030 T$ (r ² =0,99)	
<i>I. galbana</i> (CCMP 1323)	$U_{37}^{K'} = 0,0167 T - 0,0607$ (r ² = 0,99)	Versteegh <i>et al.</i> , 2001
<i>C. lamellosa</i> (HAP 17)	$U_{37}^{K'} = 0,01 T + 0,0033$ (n=3)	Rontani <i>et al.</i> , 2004

Tableau I-4. Différentes calibrations établies à partir de l'analyse d'échantillons de matière organique particulaire en fonction des zones géographiques.

Zones géographiques	Equations (T en °C)	Auteurs
Pacifique	$U_{37}^{K'} = 0,033 T + 0,043$ (r= 0,997)	Prahl & Wakeham, 1987
Atlantique nord-est	$T = 17,35 - 25,12(U_{37}^K) - 26,73 (AA36^*) + 93,90(U_{37}^K)(AA36^*)$	Conte <i>et al.</i> , 1992
Atlantique nord-est	$U_{37}^{K'} = 0,056T - 0,496$ (r ² =0,98)	Conte & Eglinton, 1993)
Océan Antarctique	$U_{37}^{K'} = 0,0414T - 0,156$	Sikes & Volkman, 1993
Océan Antarctique	$U_{37}^{K'} = 0,038 T - 0,082$ (r ² =0,921, n= 28)	Sikes <i>et al.</i> , 1997
Mer Méditerranée	$U_{37}^{K'} = 0,041T - 0,21$ (r ² =0,97, n =20)	Ternois <i>et al.</i> , 1997
Nord ouest du Japon	$U_{37}^{K'} = 0,0327T + 0,0012$ (r ² = 0,948, n=20)	Sawada <i>et al.</i> , 1998
Atlantique Nord (Les Bermudes)	$U_{37}^{K'} = -1,1365 + 0,1257 T - 0,0018T^2$ (r ² = 0,963, n= 134)	Conte <i>et al.</i> , 2001
Atlantique nord et mer Nordique	$U_{37}^{K'} = 0,027T + 0,036$ (r ² =0,97)	Sicre <i>et al.</i> , 2002

* AA36= ratio définissant l'abondance des alcénoates= ([38:3 Et]/[36:3 FAME + 36:2 FAME + 38:3 Et])

Tableau I-5. Différentes calibrations établies à partir de l'analyse d'échantillons de sédiments de surface ou de carottes sédimentaires en fonction des zones géographiques.

Zones géographiques	Equations (T en °C)	Auteurs
Pacifique (eaux tempérées)	$U_{37}^{K'} = 0,034 T + 0,039$ (n=5)	Prahl <i>et al.</i> , 1988
Pacifique (eaux tropicales)	$U_{37}^{K'} = 0,034 T + 0,039$ (n=11)	Prahl <i>et al.</i> , 1988
Océan global	$U_{37}^{K'} = 0,031 T + 0,082$ (r ² = 0,937, n = 16)	Sikes <i>et al.</i> , 1991
Nord-est Atlantique	$U_{37}^{K'} = 0,030 T + 0,093$ (r ² =0,956, n=109)	Rosell-Melé <i>et al.</i> , 1995b
Mer de Chine Sud	$U_{37}^{K'} = 0,031 T + 0,092$ (r ² =0,858, n=31)	Pelejero & Grimalt, 1997
Océan Indien	$U_{37}^{K'} = 0,033T + 0,05$ (r ² =0,947, n=54)	Sonzogni <i>et al.</i> , 1997b
Sud-est Atlantique	$U_{37}^{K'} = 0,033 T + 0,069$ (r ² =0,981, n=149)	Müller <i>et al.</i> , 1998
Océan global	$U_{37}^{K'} = 0,033 T + 0,044$ (r ² =0,958, n=370)	Müller <i>et al.</i> , 1998

Une bonne correspondance entre les calibrations de régions géographiques différentes (tableaux I-4, I-5 et I-7 ; Fig. I-16) a permis à Müller *et al.* (1998) de proposer une calibration globale basée sur 370 sites des océans Atlantique, Indien et Pacifique (60°S-60°N) :

$$U_{37}^{K'} = 0,033T + 0,044$$

Cette relation est en accord avec la calibration originale avec *E. huxleyi* ($U_{37}^{K'}=0,034T + 0,039$) de Prahla *et al.*(1988) confirmant ainsi une applicabilité générale de la calibration avec une erreur standard de $\pm 0,050$ unité soit $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$.

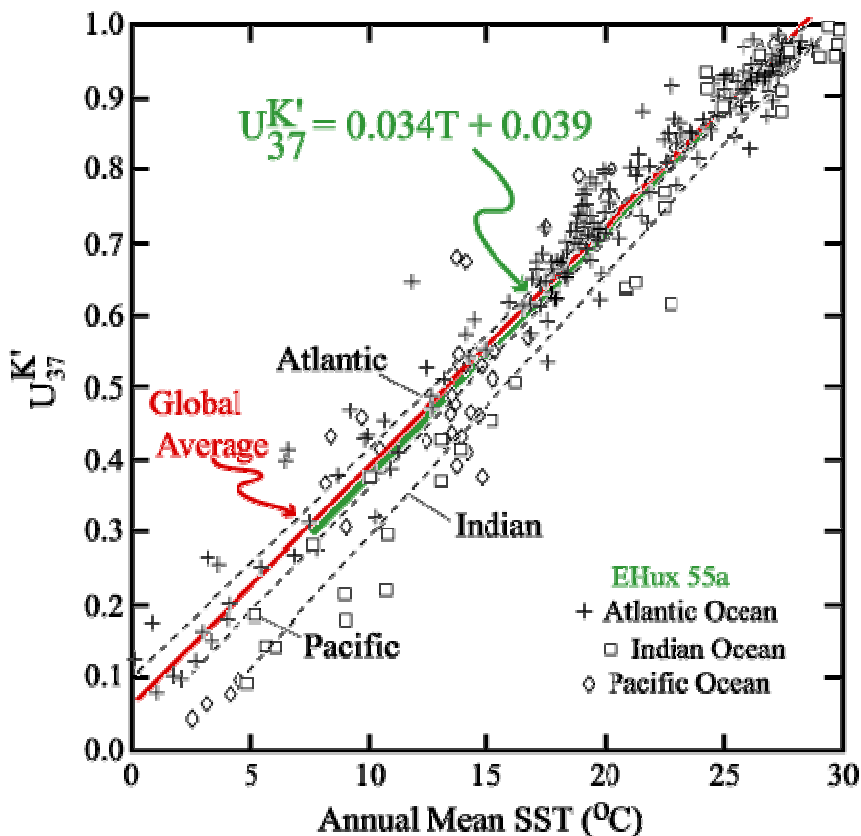


Fig. I-16. Relation linéaire entre les maSSTs (0m) et les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ calculées à partir d'échantillons de sédiments de surface provenant de diverses zones océaniques du monde entre 60°S et 60°N. Les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ proviennent de plusieurs données de la littérature (Sikes *et al.*, 1991, 1997; Rosell-Melé *et al.*, 1995b; Pelejero & Grimalt, 1997; Sonzogni *et al.*, 1997b; Müller *et al.*, 1998) et les données de températures proviennent de Levitus *et Boyer* (1994) et des archives de COADS (adaptée de Müller *et al.*, 1998).

3.2.2. Quelles calibrations pour les hautes et basses latitudes ?

L'utilisation d'une seule calibration globale (Müller *et al.*, 1998) dans les différentes aires océaniques mondiales, ne reste valable que pour des températures allant de 5 à 25°C (Sikes &

Volkman, 1993; Rosell-Melé *et al.*, 1994; Sonzogni *et al.*, 1997b; Conte *et al.*, 1998, 2001; Müller *et al.*, 1998). En effet, l'absence de corrélation, entre l'indice $U_{37}^{K'}$ et les SSTs froides ou chaudes, rend difficile l'utilisation de l'indice $U_{37}^{K'}$ dans les océans et les mers de hautes et basses latitudes. Certains auteurs ont cependant essayé d'ajuster les équations de calibration pour ces latitudes (Sikes & Volkman, 1993; Sonzogni *et al.*, 1997b; Conte *et al.*, 1998, 2001; Müller *et al.*, 1998). Néanmoins ce problème est sujet à controverse. En effet, Pelejero et Grimalt (1997) ont montré une bonne corrélation entre les températures moyennes annuelles de surface (0-30 m) et les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ obtenues à partir de l'analyse de carottes sédimentaires du sud de la mer de Chine (23-29°C), fournissant une calibration linéaire,

$$U_{37}^{K'} = 0,031T + 0,092.$$

La vraisemblance avec les équations de Prahl *et al.* (1987 ; $U_{37}^{K'} = 0,033T + 0,043$) et de Müller *et al.* (1998 ; $U_{37}^{K'} = 0,033 T + 0,044$) montrent que l' $U_{37}^{K'}$ pourrait être utilisé dans certaines zones géographiques présentant des températures supérieures à 25°C.

3.2.3. Une calibration valable à l'échelle des temps géologiques ?

Cette question est importante pour les études relatant la variabilité des climats durant les derniers cycles glaciaires et interglaciaires afin de savoir si la calibration moderne est applicable à la reconstruction des températures passées. Plusieurs espèces productrices d'alcénones sont apparues au cours des temps géologiques (Cf. Ch I-2.2.2). Ces successions pourraient influencer sur la validité des calibrations actuelles adaptées à la réponse physiologique d'*E. huxleyi* aux changements de températures. Une étude menée sur la comparaison détaillée de l'évolution de l' $U_{37}^{K'}$ par rapport à l'assemblage des coccolithes durant les derniers 290 000 ans n'a pas mis en évidence de correspondance entre les changements significatifs des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les trois grandes modifications dans la dominance des espèces de Noelaerhabdaceae produisant des alcénones (Villanueva *et al.*, 2002). Par conséquent, la variabilité dans les enregistrements sédimentaires de l' $U_{37}^{K'}$ serait attribuable à des changements de températures plutôt qu'à une calibration inadaptée aux variations d'espèces dominantes produisant les alcénones durant le Pléistocène (Villanueva *et al.*, 2002).

3.3. Les autres utilisations des alcénones

Outre leur utilisation en tant que paléomarqueurs des températures de surface, les alcénones sont également potentiellement utilisables comme paléomarqueurs de la pression partielle en CO₂ (Jasper & Hayes, 1990; Jasper *et al.*, 1994) et de la salinité (Rosell-Melé, 1998, Rosell-Melé *et al.*, 2002 ; Sicre *et al.*, 2002 ; Harada *et al.*, 2003 ; Blanz *et al.*, 2005 ; Seki, 2005 ; Schouten *et al.*, 2006).

3.3.1. La pression partielle en CO₂

Les niveaux atmosphériques de CO₂ dépendent de l'équilibre des flux entrants et sortants entre les océans et les écosystèmes terrestres. Afin de mieux définir les modifications du niveau de CO₂ atmosphériques et océaniques à travers l'histoire de la planète, plusieurs indicateurs de la paléo-PCO₂ ont vu le jour durant ces vingt dernières années. En effet, les premières constatations, dans les années 90, de la corrélation étroite entre la signature isotopique en carbone de la matière organique ($\delta^{13}\text{C}$, issu de la fixation du CO₂ lors de la photosynthèse) et la concentration en CO₂ dissous des océans, ont permis de réaliser des reconstructions de paleo-PCO₂ à partir des valeurs du $\delta^{13}\text{C}$ préservées dans la matière organique provenant des sédiments (Arthur *et al.*, 1985), de la colonne d'eau (Rau *et al.*, 1991, 1992; Freeman & Hayes, 1992; Francois *et al.*, 1993) ou de biomarqueurs spécifiques tels que les alcénones (Jasper & Hayes, 1990; Jasper *et al.*, 1994) et les phytostérols (Wakeham *et al.*, 1993). Ainsi, lors de l'analyse du $\delta^{13}\text{C}$ des alcénones dans des cultures d'*E. huxleyi* à travers une large gamme de concentrations en CO₂ (1.1-53.5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), Riebesell *et al.* (2000), ont observé une forte corrélation entre le $\delta^{13}\text{C}$ des alcénones et le CO₂ dissous. Cependant, cette relation doit être utilisée avec prudence du fait de l'influence de facteurs additionnels tels que (i) des fractionnements isotopiques différents selon les espèces photosynthétiques marines considérées (Popp *et al.*, 1998b; Burkhardt *et al.*, 1999), ou (ii) l'effet d'autres paramètres environnementaux tels que l'intensité lumineuse, le taux de croissance ou la limitation des ressources (Thompson & Calvert, 1995; Beardall *et al.*, 1998; Laws *et al.*, 1998; Popp *et al.*, 1998b; Bidigare *et al.*, 1999; Riebesell *et al.*, 2000). Toutefois, de nombreux auteurs ont entrepris des paléo-reconstructions du niveau en PCO₂ à partir du $\delta^{13}\text{C}$ des alcénones datant du Quaternaire et du Miocène (Jasper & Hayes, 1990; Jasper *et al.*, 1994; Andersen *et al.*, 1999; Pagani *et al.*, 1999, 2002).

3.3.2. La salinité

3.3.2.1. La composition isotopique en hydrogène

Il est admis que la composition isotopique de l'hydrogène (δD) de composés organiques spécifiques, reflète les δD des eaux environnementales (Sauer *et al.*, 2001; Sachse *et al.*, 2004; Englebrecht & Sachs, 2005). La composition isotopique de l'oxygène et de l'hydrogène dépend principalement du degré d'évaporation (et par conséquent de la température) et de l'afflux d'eau douce (et par conséquent des précipitations), elle peut donc être utilisée pour estimer la salinité des eaux marines (Schouten *et al.*, 2006).

Afin de vérifier l'influence de la température et de la salinité sur la composition isotopique de l'hydrogène (δD) des alcénones, Schouten *et al.* (2006) ont entrepris de cultiver des cellules d'*E. huxleyi* et de *G. oceanica* à différentes températures et à différentes salinités. Les résultats obtenus n'ont pas montré de corrélation significative entre le δD des alcénones et la température du milieu alors qu'une corrélation linéaire positive a été observée entre le δD des alcénones et la salinité du milieu, à la fois chez *E. huxleyi* (Fig. I-17) et chez *G. oceanica*. Ces résultats ont ainsi démontré que la salinité peut avoir un impact important sur le δD des alcénones dans les environnements naturels et par conséquent les auteurs ont proposé d'utiliser le δD des alcénones pour la reconstruction des paléosalinités.

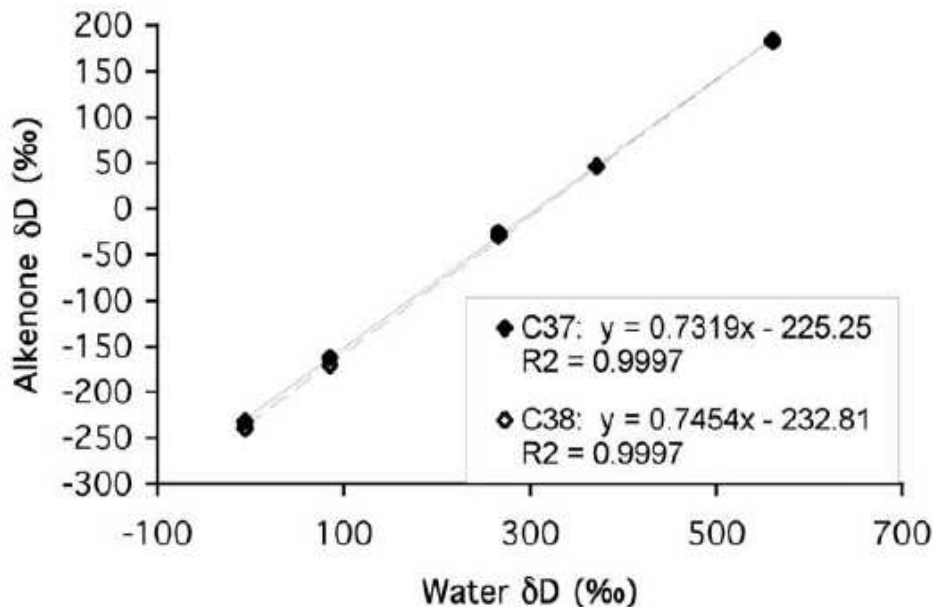


Fig. I-17. Variation de la composition isotopique en hydrogène des alcénones C_{37} et C_{38} provenant de cultures d'*E. huxleyi* en fonction de la composition isotopique en hydrogène du milieu de culture (Englebrecht & Sachs, 2005).

3.3.2.2. Le pourcentage en alcénones C₃₇ tétra-insaturées

D'autres auteurs ont proposé d'utiliser le pourcentage de C_{37:4} (abondance relative de l'alcénone C_{37:4} sur l'abondance totale des alcénones C_{37:2}, C_{37:3} et C_{37:4}) comme indice de la salinité (Rosell-Melé, 1998; Sicre *et al.*, 2002). En effet, lorsque le pourcentage en C_{37:4} (%C_{37:4}) est > 5%, la relation entre les alcénones et la température semble se briser alors qu'une corrélation avec la salinité a été suggérée dans diverses zones géographiques: l'océan Atlantique nord et la mer du Nord (Rosell-Melé *et al.*, 2002; Sicre *et al.*, 2002) ; le détroit de Béring (Harada *et al.*, 2003); la mer Baltique (Blanz *et al.*, 2005) et la mer de Okhotsk (Seki *et al.*, 2005).

Tableau I-6. Tableau récapitulatif des différentes relations mises en évidence entre le %C_{37:4} et la salinité

<u>Bassins océaniques</u>	<u>Regression linéaire</u> (S= salinité en psu)	<u>R²</u>	<u>Auteurs</u>
Atlantique nord et mer du Nord	%C _{37:4} = 146.9 (±10.6) - 4.1 S (±0.3)	0,69	Rosell-Melé <i>et al.</i> , 2002
Atlantique nord	%C _{37:4} = 48.1 S + 1691	0,78	Sicre <i>et al.</i> , 2002
Détroit de Béring	%C _{37:4} = 11.7 S + 397.6	0,76	Harada <i>et al.</i> , 2003

Cependant, l'utilisation de cet outil présente de nombreuses limites. La concentration en alcénones C_{37:4} doit être suffisante et par conséquent son utilisation est restreinte à des environnements particuliers (Cf. Ch. I-2.2.1). Cependant, même dans des régions océaniques où la quantité en C_{37:4} se révèle suffisante, une variabilité significative a pu être observée (tableau I-6). De plus, certains auteurs n'ont pas pu mettre en évidence de corrélation entre le %C_{37:4} présent dans le matériel particulaire ou les sédiments et la salinité dans plusieurs secteurs des océans Atlantique, Pacifique et Antarctique (Sikes & Sicre, 2002) et dans la mer du Nord (Bendle *et al.*, 2005). L'application du %C_{37:4} comme paléomarqueur de la salinité apparaît donc restreint à certains environnements froids à faible salinité.

3.4. Les différentes études menées

Depuis la découverte des alcénones, de nombreuses études ont confirmé l'utilité et la véracité de cet outil pour la reconstruction des paléotempératures de surface. Cette partie se propose d'établir une liste non exhaustive de plusieurs études ayant utilisé les alcénones en tant que paléomarqueurs des températures de surface, de salinité, ou encore de la pression partielle en CO₂, présentes ou passées (tableaux I-7 et I-8 respectivement), ainsi que de nombreuses

études mettant en évidence la corrélation entre les paléoSSTs enregistrées par les alcénones et les informations apportées par d'autres paléomarqueurs (tableau I-9).

Tableau I-7. Liste (non exhaustive) des différentes études mettant en évidence une bonne corrélation entre les SSTs enregistrées par les alcénones et les SSTs actuelles.

<u>Auteurs</u>	<u>Zones géographiques</u>	<u>Matériaux analysés pour les mesures de $U_{37}^{K'}$</u>
Sikes <i>et al.</i> , 1991	Océan global	Surface des sédiments
Rosell-Melé <i>et al.</i> , 1995b	Océan Atlantique nord-est	Surface des sédiments (n=109)
Ternois <i>et al.</i> , 1996	Mer Méditerranée nord-est	A 200m de profondeur durant un an d'échantillonnage par trappes
Pelejero & Grimalt, 1997	Mer de Chine Sud	Surface des sédiments
Sonzogni <i>et al.</i> , 1997b	Océan Indien	Surface des sédiments
Sikes <i>et al.</i> , 1997	Océan Antarctique	Eau de surface et surface des sédiments
Müller <i>et al.</i> , 1998	Océan Atlantique sud-est et Océan global	Surface des sédiments (n=149)
Müller & Fischer, 2001	Nord ouest de l'Afrique (région côtière du Cap blanc)	Matériel particulaire prélevé par trappes et surface des sédiments durant 4 ans (1988-1991).

Tableau I-8. Liste (non exhaustive) des différentes études mettant en évidence une bonne corrélation entre les SSTs (ou PCO₂) enregistrées par les alcénones et les SSTs passées (ou paléo-CO₂).

<u>Auteurs</u>	<u>Zones géographiques</u>	<u>Périodes analysées</u>	<u>Reconstructions à partir des profils stratigraphiques en alcénones</u>
Mccaffrey <i>et al.</i> , 1990	Pérou	XIXème siècle	Evénements d'El Niño
Farrimond <i>et al.</i> , 1990	Pérou	Derniers 350 000 ans	Paléotempératures
ten Have & Kroon, 1991	Mer d'Arabie occidentale	Pléistocène	Paléotempératures
Kennedy & Brassell, 1992	Californie (Bassin de Santa Barbara)	XXème siècle	Correspondance des paléotempératures avec les événements d'El Niño
Jasper <i>et al.</i> , 1994	Océan Pacifique équatorial	Derniers 255000 ans	Paléo-PCO ₂
Prahl <i>et al.</i> , 1995	Océan Pacifique nord-est	Derniers 30000 ans	Paléotempératures
Zhao <i>et al.</i> , 1995	Nord Ouest de l'Afrique	Derniers 80000 ans	Paléotempératures
Bard <i>et al.</i> , 1997	Océan Indien	Dernière déglaciation	Paléotempératures
Andersen <i>et al.</i> , 1999	Océan Atlantique Sud	Quaternaire	Paléo-PCO ₂
Ruehleman <i>et al.</i> , 1999	Océan Atlantique tropical	Derniers 29000 ans	Paléotempératures
Sachs & Lehman, 1999	Océan Atlantique subtropical (Les Bermudes)	60000 à 30000 ans	Paléotempératures
Ternois <i>et al.</i> , 2000	Nord-ouest de l'Afrique	Derniers 29000 ans	Paléotempératures
Zhao <i>et al.</i> , 2000	Californie (Bassin de Santa Barbara)	XV à XXème siècle	Paléotempératures
Pagani <i>et al.</i> , 2002	Océan Pacifique central	Holocène	Paléo-PCO ₂
Rosell-Melé <i>et al.</i> , 2002	Océan Atlantique nord-est	Dernière période glaciaire	Paléosalinité à partir du %C _{37:4}
Brassell <i>et al.</i> , 2004	Océan Pacifique ouest	Aptien	Paléotempératures et paléo-PCO ₂
Theissen <i>et al.</i> , 2005	Sud de l'Amérique (lac Titicaca)	Holocène	Paléotempératures
Lawrence <i>et al.</i> , 2006	Océan Pacifique tropical	Période glaciation Plio-Pleistocene	Paléotempératures
McGregor <i>et al.</i> , 2007	Nord-ouest de l'Afrique	Derniers 2500 ans	Paléotempératures
Sicre <i>et al.</i> , 2008	Islande (Nord)	Derniers 2000 ans	Paléotempératures

Tableau I-9. Liste (non exhaustive) des différentes études mettant en évidence une corrélation entre les paléoSSTs (ou paléosalinité*) enregistrées par les alcénones et les informations apportées par d'autres proxies.

<u>Auteurs</u>	<u>Zones géographiques</u>	<u>Périodes analysées</u>	<u>Paléomarqueurs utilisés pour l'analyse comparative</u>
Brassell <i>et al.</i> , 1986	Océan Atlantique équatorial	Quaternaire	composition isotopique de l'oxygène ($\delta^{18}\text{O}$) sur les tests de foraminifères
ten Haven <i>et al.</i> , 1987	Mer Méditerranée	Quaternaire	$\delta^{18}\text{O}$ et enregistrements de pollens contenus dans des sapropels
Poynter <i>et al.</i> , 1989	Ouest de l'Afrique	Dernier 575000 ans	$\delta^{18}\text{O}$ dans les carottes sédimentaires.
Eglinton <i>et al.</i> , 1992	Nord ouest de l'Afrique	Age glaciaire (Quaternaire)	$\delta^{18}\text{O}$ de tests de foraminifères.
*Rostek <i>et al.</i> , 1993	Joncture mer d'Arabie et baie de Bengale	Derniers 170000 ans	$\delta^{18}\text{O}$ sur les tests de foraminifères
Rostek <i>et al.</i> , 1997	Mer d'Arabie est et sud-est	Dernier cycle climatique	$\delta^{18}\text{O}$ de tests de foraminifères afin d'étudier les variations des moussons.
Sonzogni <i>et al.</i> , 1998	Océan Indien	Dernière période glaciaire	$\delta^{18}\text{O}$ sur les tests du foraminifère <i>G. ruber</i> .
Villanueva <i>et al.</i> , 1998	Océan Atlantique central	Derniers 280000 ans.	$\delta^{18}\text{O}$ de tests de foraminifères
Cacho <i>et al.</i> , 1998	Mer Alboran (mer Méditerranée ouest)	Derniers 50000 ans	$\delta^{18}\text{O}$ des glaciers de Groenland
Cayre & Bard, 1999	Mer d'Arabie est	Dernière glaciation	$\delta^{18}\text{O}$ sur les tests de foraminifères
Sicre <i>et al.</i> , 2001	Nord-ouest de l'Afrique	Derniers 70000 ans	$\delta^{18}\text{O}$ du foraminifère <i>G. bulloides</i>
Bard, 2001	Mer de Chine sud, Nord Atlantique, Océan Indien	Dernière période glaciaire	Divers (Mg/Ca ; distribution de foraminifères...)
Zink <i>et al.</i> , 2001	Lacs d'Allemagne, d'Australie, de Russie et des U.S.	Holocène	$\delta^{18}\text{O}$ dans le calcaire des lacs

4. Les alcénones, un bon paléomarqueur ?

4.1. Les atouts de ce paléomarqueur

Les alcénones présentent de nombreux avantages en tant que paléomarqueurs et sont très rapidement devenues indispensables aux études de paléotempératures (Cf. Ch. I-3.4). Elles permettent en outre de palier à de nombreuses limites d'autres paléomarqueurs.

4.1.1. La stabilité de l'indice $U_{37}^{K'}$ face aux variables environnementales autres que la température

A l'inverse d'autres paléomarqueurs tels que les valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ des tests de foraminifères, ou le ratio Mg/Ca dans les foraminifères ou encore les assemblages d'espèces planctoniques (foraminifères, radiolaires, diatomées), l'indice $U_{37}^{K'}$ (taux d'insaturation des alcénones) est apparu relativement insensible aux facteurs environnementaux tels que la salinité du milieu de croissance (Sikes *et al.*, 1991; Sonzogni *et al.*, 1997a), le volume des glaces ou encore la dissolution du carbonate de calcium (Sikes *et al.*, 1991; Sachs *et al.*, 2007). De même, la variation de la concentration en CO_2 ne semble pas influencer significativement les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (Riebesell *et al.*, 2000).

4.1.2. La facilité d'analyse et de conservation des alcénones

Les alcénones en C_{37} ne semblent pas affectées par le stockage des échantillons sur le long terme (Sikes *et al.*, 1991). Elles sont facilement extraites des sédiments grâce à des procédures usuelles et peuvent facilement être identifiées et quantifiées à de faibles concentrations par CPG-SM (Volkman *et al.*, 1980b; Brassell *et al.*, 1986; Rosell-Melé *et al.*, 1995a; Rontani *et al.*, 2001) (Cf. Ch. I-2.5).

4.1.3. La précision des mesures de l' $U_{37}^{K'}$

L'exactitude des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ est de l'ordre de $\pm 0,02$ unités, soit un niveau de précision correspondant $\pm 0,6^\circ\text{C}$ (Prah & Wakeham, 1987; Sikes & Volkman, 1993), ce qui rend cet outil essentiel pour l'analyse d'événements caractérisés par de faibles variations de températures. Il permet ainsi d'évaluer de larges gammes de variations d'échelles de temps

telles que les variations entre les épisodes glaciaires et interglaciaires (10^6 ans) ou durant des périodes de 100 ans (Eglinton *et al.*, 1992) ou encore des événements plus courts tel que El-Nino (10 ans, Kennedy & Brassell, 1992).

Du fait d'une forte corrélation linéaire, entre l' $U_{37}^{K'}$ et les maSSTs, obtenue à partir de nombreuses zones géographiques (Cf. Müller *et al.*, 1998) et puisque les alcénones sont synthétisées par des haptophytes vivant dans la couche photique (en raison de leur besoin en lumière pour leur photosynthèse; Winter *et al.*, 1994), les valeurs de températures mesurées à partir des alcénones reflèteraient les températures annuelles moyennes de surface (Rosell-Melé *et al.*, 1995b; Sikes *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1998).

4.1.4. L'utilisation de l' $U_{37}^{K'}$ à larges échelles de temps et d'espace

L'ubiquité des alcénones dans le temps (jusqu'au Crétacé; de Leeuw *et al.*, 1980; Farrimond *et al.*, 1986; Brassell *et al.*, 2004; Cf. Ch. I-2.1) et l'espace (océans de la planète ainsi que de nombreux lacs et rivières, Cf. Ch. I-2.2 et tableau I-2) est un atout majeur pour remonter l'historique des climats à l'échelle des temps géologiques sur une vaste étendue géographique. L'observation d'alcénones dans de nombreux sédiments limniques (et autres environnements particuliers, Cf. Ch. I-2.2) rend possible l'application des estimations de paléotempératures basées sur l' $U_{37}^{K'}$ à ces environnements. Cependant, une question essentielle reste en suspend : est-ce que la relation entre l' $U_{37}^{K'}$ et les maSSTs que nous connaissons dans les océans ouverts est valable pour d'autres environnements ? En effet, du fait des particularités propres aux systèmes lacustres et autres environnements particuliers (différences physiques, chimiques et biologiques), l'application de l' $U_{37}^{K'}$ comme paléothermomètre semble difficile. Certains auteurs ont pu mettre en évidence une utilisation possible des alcénones dans les systèmes limniques du fait d'une bonne corrélation entre les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les $\delta^{18}O$ (Sheng *et al.*, 1999; Zink *et al.*, 2001; Theissen *et al.*, 2005), ou entre les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les températures de surface (Zink *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2005). Néanmoins, d'autres auteurs ont démontré une incohérence entre les températures issues de l' $U_{37}^{K'}$ et les eaux de surface et ont attribué cette différence à une calibration mal adaptée à ces environnements particuliers (Freeman & Wakeham, 1992; Ficken & Farrimond, 1995; Thiel *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2007).

4.1.5. La résistance des alcénones aux processus de dégradation

Plusieurs études ont montré que le taux d'insaturation des alcénones en C₃₇, une fois les alcénones synthétisées par le phytoplancton, ne semblaient pas significativement altéré par la dégradation durant les processus de diagenèse (Prahl *et al.*, 1989a, 1993 ; Conte *et al.*, 1992 ; Madureira *et al.*, 1995 ; Teece *et al.*, 1998).

4.1.5.1. La résistance au broutage par le zooplancton

Bien que généralement les lipides soient altérés lors du broutage par le zooplancton, avec le plus souvent une perte sélective de la forme la plus insaturée (Harvey *et al.*, 1987), les alcénones ne semblent pas subir d'altération le long de la chaîne alimentaire, survivant à la digestion par le zooplancton (copépodes et moules) au cours de leur sédimentation (Volkman *et al.*, 1980b; Grice *et al.*, 1998). En effet, les travaux de Volkman *et al.* (1980b), ont montré que les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ restaient inchangées dans les pelotes fécales de *Calanus hegolandicus* après ingestion d'*E. huxleyi*. De même, Grice *et al.* (1998), n'ont pas observé de changements dans les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ après ingestion d'*I. galbana* par le copépode *Temora longicornis*. La relative préservation des alcénones dans les sédiments et à travers la colonne d'eau a été attribuée à la structure particulière de ces molécules (longue chaîne carbonée, espacement des doubles liaisons inhabituel, configuration *trans* des doubles liaisons (Rechka & Maxwell, 1988); Prahl & Wakeham, 1987).

4.1.5.2. La résistance à la dégradation bactérienne

La première étude de l'effet de la dégradation bactérienne sur l'indice d'insaturation des alcénones durant la diagenèse a été entreprise en 1998 par Teece *et al.* (1998). Durant leurs travaux, ces auteurs incubèrent des cellules d'*E. huxleyi* avec un sédiment estuarien dans différentes conditions (oxiques, sulfatoréductrices et méthanogènes) afin de tester si une action microbienne pouvait influencer sur l' $U_{37}^{K'}$. Bien qu'une dégradation importante des alcénones en C₃₇ ait été observée dans toutes les conditions testées (jusqu'à 85% en conditions aérobies), les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ sont restées relativement constantes (biais inférieur à 0,4°C). De plus, les alcénones ont été dégradées bien plus lentement que la plupart des autres lipides, ce qui fut une fois encore attribué à la configuration *trans* de leurs doubles liaisons (Rechka & Maxwell, 1988). Ces auteurs en ont conclu que l' $U_{37}^{K'}$ n'était pas altéré par

des processus de biodégradation et ont confirmé la robustesse de cet outil pour les estimations de paléotempératures.

Les résultats de Sun *et al.* (2004), obtenus lors d'incubations d'*E. huxleyi* dans de l'eau de mer collectée dans le Bassin de Cariaco dans des conditions oxiqes et anoxiques, confirmèrent les observations précédentes de Teece *et al.* (1998), à savoir qu'une dégradation microbienne des alcénones semblait n'avoir que peu d'impact sur les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et ceci malgré une dégradation complète des alcénones au bout de 2 mois en conditions oxiqes et une dégradation très importante (90 à 94 % de la concentration initiale dégradée) au bout de trois mois en conditions anoxiques.

4.2. Les limites de ce paléomarqueur

4.2.1. Les incohérences observées entre les températures calculées à partir des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les températures actuelles mesurées à la surface des eaux

Bien que la mesure de l'indice $U_{37}^{K'}$ soit devenue une méthode de routine pour la reconstruction de paléotempératures (Cf. Ch. I-3.4), les relations liant le taux d'insaturation des alcénones ($U_{37}^{K'}$) et les températures de surface, ne sont pas si claires. En fait, en dépit d'une apparente robustesse (Cf. tableaux I-7, I-8 et I-9), de nombreuses études ont mis en évidence des incohérences entre les températures obtenues à partir des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les maSSTs mesurées *in situ* (tableau I-10) et de nombreuses hypothèses ont été émises afin d'expliquer ces écarts aux températures (tableau I-10).

Tableau I-10. Liste (non-exhaustive) de différentes études mettant en évidence des incohérences observées entre les températures calculées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ et les SSTs mesurées in situ.

<u>Auteurs</u>	<u>Zones géographiques</u>	<u>Type d'échantillons</u>	<u>Incohérences observées entre l'$U_{37}^{K'}$ et les maSSTs</u>	<u>Hypothèses pouvant expliquer ces incohérences</u>
Freeman & Wakeham, 1992	Mer Noire	Matière organique particulaire en suspension	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus basses et augmentant fortement avec la profondeur	(i) Taille des particules analysées (temps de résidence très élevé dans la colonne d'eau) (ii) Calibrations non adaptées (iii) Variations naturelles de la profondeur et de la période de biosynthèse des alcénones (iv) Dégradation sélective des alcénones les plus insaturées lors de la sédimentation
Conte <i>et al.</i> , 1992	Atlantique nord-est (46°-60°N)	Particules en suspension et surface du sédiment	Absence de corrélation linéaire entre SSTs et les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$	(i) Mauvaise calibration (ii) Forte saisonnalité de production des alcénones : les températures enregistrées par les alcénones refléteraient la température de la zone euphotique durant le bloom de printemps.
Conte & Eglinton, 1993	Atlantique nord-est (26-61°N)	Matériel particulaire >0,8µ	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus élevées	(i) Adaptation physiologique aux températures >16-17°C (ii) Espèces d'haptophytes différentes en fonction des zones froides ou chaudes.
Ficken & Farrimond, 1995	Fjords Norvégiens	Carottes sédimentaires	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus faibles	(i) Succession de différentes sources biologiques productrices d'alcénones (ii) Processus de dégradation sélective en conditions oxygènes.
Sawada <i>et al.</i> , 1998	Pacifique nord ouest (Japon central)	Matériel particulaire prélevé par trappes	Valeurs $U_{37}^{K'}$ plus faibles	Formation au niveau de la thermocline saisonnière
Benthien & Müller, 2000	Atlantique sud-ouest (Bassin d'Argentine)	Surface du sédiment	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus faibles (-2 à -6 °C)	(i) Production préférentielle d'alcénones sous la couche de mélange ou durant la saison froide (ii) Déplacement latéral de matière en suspension provenant de régions plus froides
Schulz <i>et al.</i> , 2000	Mer Baltique	Surface du sédiment	Grande variabilité des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$	(i) Présence d'haptophytes spécifiques en fonction de la salinité (ii) Changement dans la biosynthèse des alcénones dû à un stress physiologique causé par les variations de salinité.
Conte <i>et al.</i> , 2001	Atlantique nord (mer des Sargasses ouest)	Matériel particulaire prélevé dans la zone euphotique	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus basses (≈ -1°C)	(i) Variation saisonnière du taux de dégradation et /ou de la production (ii) Variation de la profondeur de production des alcénones (iii) Mauvaise calibration
Goni <i>et al.</i> , 2001	Golfe de Californie (bassin de Guaymas)	Trappes à sédiments	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ incohérentes à des températures >26°C	(i) Changement dans les espèces dominantes de coccolithophores (ii) Evolution de la thermocline durant les périodes de hautes températures
Goni <i>et al.</i> , 2001	Golfe de Californie	Trappes à sédiments	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus élevées (≈+1°C)	Transport latéral d'alcénones provenant d'autres régions du Golfe
Harada <i>et al.</i> , 2001	Pacifique équatorial	Trappes à sédiments	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus basses (1-3°C)	Profondeur de production des alcénones vers 100m
Theissen <i>et al.</i> , 2005	Lac Titicaca (Amérique du sud)	Carottes sédimentaires	Les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus basses (4 à 7°C)	(i) Calibrations non adaptées aux environnements lacustres (ii) Mauvaise qualité analytique (concentration en alcénones trop faible)
Prahl <i>et al.</i> , 2005	Pacifique subtropical nord	Particules en suspension + trappes (2 ans)	Grande variabilité des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$	(i) Mauvaise calibration (ii) Réponse physiologique en réponse à des stress nutritifs ou une variation de l'intensité lumineuse
Sikes <i>et al.</i> , 2005	Pacifique sud-ouest (subtropical)	Trappes à sédiments	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus faibles (-4°C)	Réponse physiologique à divers stress tels que des stress nutritifs ou une variation de l'intensité lumineuse
Sikes <i>et al.</i> , 2005	Pacifique sud-ouest (subantarctique)	Trappes à sédiments	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus élevées (+4°C)	Réponse physiologique des haptophytes à des facteurs écologiques tels que la variation de l'intensité lumineuse ou un stress trophique (compétition inter-spécifique)
Ruhlemann & Butzin, 2006	Atlantique sud ouest (bassin d'Argentine)	Particules en suspension	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus faibles (-4 à -7°C)	Matière organique provenant d'eaux plus froides et transportées par le courant de Malvinas.
Popp <i>et al.</i> , 2006	Pacifique subtropical nord	Particules en suspension	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus faibles (-2 à 4°C) en été et en automne et plus élevées (+1 à 2°C) en hiver.	Réponse physiologique des haptophytes à une limitation de la disponibilité en nutriments et de l'intensité lumineuse
Conte <i>et al.</i> , 2006	Océan global	Surface du sédiment (n=629)	Valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ plus élevées	(i) Saisonnalité de la production des alcénones (ii) Formation de la thermocline (iii) Diagenèse différentielle entre le $C_{37:3}$ vs $C_{37:2}$ (iv) Advection latérale d'alcénones dans des régions à forts courants

Tableau I-11. Liste (non-exhaustive) de différentes études mettant en évidence des incohérences observées entre les températures calculées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ et les températures passées déterminées à l'aide d'autres paléomarqueurs.

<u>Auteurs</u>	<u>Zones géographiques</u>	<u>Période analysée</u>	<u>Incohérences observées entre l'$U_{37}^{K'}$ et les SST passés</u>	<u>Hypothèses pouvant expliquer ces incohérences</u>
Sikes & Keigwin, 1994	Atlantique équatorial	Derniers 30 000 ans	Différence significative entre les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$, du $\delta^{18}O$ des foraminifères et les assemblages de foraminifères.	(i) Changement de la profondeur de la thermocline (ii) Variation saisonnière
Sikes & Keigwin, 1996	Irlande	Derniers 15 000 ans	Différence significative entre les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (plus élevées), du $\delta^{18}O$ des foraminifères et les assemblages de foraminifères.	Variabilité de l'habitat en fonction de la source (haptophytes vs. foraminifères) des paléomarqueurs étudiées
Hoefs <i>et al.</i> , 1998	Atlantique nord (plaine abyssale de Madère)	Pliocène et Miocène	Variation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ entre les couches sédimentaires oxiques vs. anoxiques.	Dégradation préférentielle de composé le plus insaturé ($C_{37:3}$ vs. $C_{37:2}$) dans des conditions oxiques.
Weaver <i>et al.</i> , 1999	Atlantique nord (59°N, 23°W)	Derniers 120 000 ans	Des températures dérivées de l' $U_{37}^{K'}$ anormalement hautes	(i) Remaniement des alcénones à partir des sédiments du Crétacé (ii) Mauvaise calibration
Xu <i>et al.</i> , 2001	Mer Noire	Holocène	Des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ particulièrement variables et inattendues.	Contribution de différentes souches ou espèces productrices d'alcénones
Ishiwatari <i>et al.</i> , 2001	Pacifique nord-ouest (mer du Japon)	Derniers 36 000 ans	Des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ anormalement hautes par rapport aux températures obtenues à partir du δO^{18} des foraminifères	(i) Changement saisonnier dans la productivité maximale des alcénones (ii) Stratification des eaux de surface
Villanueva <i>et al.</i> , 2002	Atlantique Nord	Derniers 29000 ans	Valeurs de l' $U_{37}^{K'} > 3-4,5^{\circ}C$ aux valeurs du δO^{18} des foraminifères	Réduction de l'influence des eaux polaires (Villanueva <i>et al.</i> , 1998)
Sikes <i>et al.</i> , 2002)	Nouvelle-Zélande, eaux subantarctiques	Pré Holocène	Différence significative entre les reconstructions obtenues à partir des alcénones et des assemblages de foraminifères.	(i) Saisonnalité et profondeur de croissance des espèces utilisées (ii) Modification environnementale (augmentation des upwellings, des vents, approfondissement de la thermocline et stratification)
Seki <i>et al.</i> , 2004	Pacifique nord-ouest (mer d'Okhotsk)	Derniers 15 000 à 30 000 ans	Des températures calculées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ anormalement hautes	(i) Changement saisonnier dans la productivité maximale des alcénones (ii) Contribution de différentes souches ou espèces productrices d'alcénones
Sicre <i>et al.</i> , 2006	Océan Antarctique	Dernier âge glaciaire (50 000 ans)	Le δO^{18} des foraminifères affiche un refroidissement alors que l' $U_{37}^{K'}$ indique un réchauffement.	Advection des alcénones transportées de l'Océan Indien par le courant de surface Aghulas

4.2.2. Les incohérences lors des études de températures passées

Ces incohérences ne se limitent pas aux études portant sur les températures actuelles. Il est cependant plus difficile d'affirmer l'existence d'incohérences avec les températures passées du fait de l'absence de données concrètes sur les températures de surface. Toutefois, bien qu'une concordance générale entre les enregistrements de l' $U_{37}^{K'}$ et du $\delta^{18}O$ durant les périodes glaciaires et interglaciaires ait été admise (tableau I-9), des différences ont aussi été observées (tableau I-11). De manière générale, les incohérences observées entre les températures calculées à partir des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les températures obtenues à partir d'autres paléomarqueurs sont généralement dues à une augmentation inexplicée des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (tableau I-11).

Devant l'étendue des études mettant en avant une variabilité inattendue dans les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$, il semble évident que les alcénones ne sont pas si stables qu'elles ne le laissent paraître durant les premières études. Bien que de nombreuses hypothèses aient été émises afin d'expliquer ces incohérences, la cause en reste obscure et résulte sans doute d'une combinaison de facteurs différents.

4.2.3. Les causes potentielles de ces incohérences

4.2.3.1. Les incohérences liées à la qualité de l'analyse

La mesure quantitative des alcénones est maintenant devenue une technique usuelle dans la plupart des laboratoires de paléocéanographie. La reproductibilité des mesures avec une précision maximale est fondamentale afin de bien interpréter les reconstructions de paléotempératures à partir des alcénones. Cependant, l'utilisation de techniques d'analyse très variées (de sensibilités très différentes, Cf. Ch. I-2.5) et le manque d'études concernant la précision et la reproductibilité des méthodes analytiques constituent des points faibles de l'utilisation de l' $U_{37}^{K'}$.

Une étude de Rosell-Melé *et al.* (2001), s'est efforcée de mettre en évidence les contraintes analytiques que nous pouvons rencontrer lors de l'analyse des alcénones. Pour cela, ces auteurs ont entrepris de réaliser une inter-calibration entre 24 laboratoires à travers le monde entier. Cette vaste étude visait à analyser la composition en alcénones, de mélanges standards

et de plusieurs échantillons sédimentaires naturels, afin d'évaluer si des différences significatives apparaissaient entre les différents laboratoires et en fonction des méthodes utilisées. La variabilité dans les estimations de températures basées sur l' $U_{37}^{K'}$ entre deux laboratoires a atteint 2,1°C tandis que la précision au sein d'un même laboratoire était inférieure à 1,6°C. La reproductibilité des valeurs des concentrations en alcénones obtenues par les différents laboratoires a été estimée à 32% alors que la répétabilité au sein d'un même laboratoire était de 24%. Dans la plupart des laboratoires testés, les valeurs de l'indice $U_{37}^{K'}$ obtenues à partir des mélanges standards, étaient plus hautes que les valeurs attendues. Ceci pourrait s'expliquer par une sous-estimation de l'alcénone en $C_{37:3}$ (qui semble être préférentiellement adsorbée dans le chromatographe en phase gazeuse que l'alcénone en $C_{37:2}$, Rosell-Melé *et al.*, 1995a; Villanueva & Grimalt, 1996, 1997).

La concentration en alcénones dans les échantillons semble être un facteur très important et change considérablement la reproductibilité des résultats. Si la concentration en alcénones se trouve être inférieure à 300 ng.g⁻¹, la répétabilité est alors supérieure à 2,2°C alors que pour une concentration supérieure à 1 µg.g⁻¹, la répétabilité est inférieure à 1,5°C (Rosell-Melé *et al.*, 2001). Préalablement à cette étude, Villanueva et Grimalt (1996) avaient montré qu'une concentration en alcénones inférieure à 10 ng dans les échantillons analysés, pouvait apporter une déviation de l'ordre de 0,5°C dans les prédictions de températures.

Si l'on tient compte de la grande variété des techniques utilisées par les différents laboratoires impliqués dans cette inter-calibration, la variabilité des résultats obtenus (Rosell-Melé *et al.*, 2001) peut à priori sembler acceptable. Cependant, si l'on considère que les écarts de températures entre l'holocène et le dernier âge glaciaire dans de nombreuses aires du monde n'excèdent pas 2°C (CLIMAP), l'ordre de grandeur des biais observés entre les différents laboratoires est significative et montre clairement la nécessité de standardiser l'analyse des alcénones dans les échantillons naturels en employant une des méthodes analytiques qui semblent les plus précises et spécifiques telles que les techniques proposées par Rosell-Melé *et al.* (1995a; CPG-SM en mode d'ionisation chimique positive) et Rontani *et al.* (2001; CPG-SMEI en mode SIM après réduction et silylation) (*Cf.* Ch. I-2.5).

4.2.3.2. *Les incohérences liées à une variabilité spatiale et/ou temporelle dans l'apport d'alcénones*

4.2.3.2.1. *L'apport d'alcénones allochtones par transport horizontal et vertical*

De nombreuses études ont attribué certaines incohérences à l'existence de mouvements de la matière organique. Re-suspension, transport latéral et advection de particules en suspension (Conte *et al.*, 1992; Sawada *et al.*, 1998; Thomsen *et al.*, 1998; Sicre *et al.*, 1999; Goni *et al.*, 2001) sont autant de phénomènes qui interviennent dans l'environnement marin sous l'effet des courants, des tourbillons, des vents, etc. Par exemple, en partant du principe que les particules plus denses telles que les foraminifères planctoniques couleraient rapidement, les particules plus fines enrichies en matériel organique, pourraient être transportées sur de longues distances. Ce transport latéral pourrait ainsi introduire de la matière organique provenant de régions plus froides ou plus chaudes et compromettrait ainsi les interprétations du signal climatique régional (Sachs *et al.*, 2000).

Au sud-ouest de l'Atlantique, dans la région de confluence du Brésil et des Malvines, Benthien et Müller (2000), puis Rühlemann et Butzin (2006), ont trouvé des valeurs de SSTs à partir des alcénones significativement plus basses que les SSTs réelles, qui pourraient s'expliquer par le déplacement latéral de particules en suspension provenant d'eaux plus froides, du fait de forts courants de surface et de profondeur et de l'intervention de tempêtes.

A partir d'échantillons de matériel particulaire prélevés par trappes au nord-est de l'Atlantique (48°N ; 21°W), Rosell-Melé *et al.* (2000) ont obtenu des valeurs d' $U_{37}^{K'}$ anormalement basses. Ces auteurs ont attribué ces incohérences à l'apport d'alcénones provenant des eaux sub-polaires. En effet, l'existence de forts courants dans cette région, associés à la présence de *Coccolithus pelaginus* (espèce retrouvée dans les eaux sub-polaires dont l'optimum de croissance se situe dans une gamme de température allant de 2 à 12°C, Okada & McIntyre, 1979) dans les échantillons collectés, expliqueraient potentiellement les faibles valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ calculées, qui se trouvent être proches des valeurs trouvées à la surface du sédiment dans ces zones polaires.

4.2.3.2.2. Variation saisonnière du taux de dégradation des alcénones

Une hypothèse alternative à l'apport d'alcénones allochtones est celle d'une dégradation différentielle des alcénones autochtones en fonction des saisons, privilégiant un apport sédimentaire d'alcénones synthétisées en périodes plus froides ou plus chaudes. Une disparité dans l'importance des flux d'alcénones en fonction des saisons a pu être mise en évidence par plusieurs auteurs (Conte *et al.*, 1992, 2001; Thomsen *et al.*, 1998; Sicre *et al.*, 1999, 2002; Goni *et al.*, 2001; Müller & Fischer, 2001). Diverses hypothèses ont été proposées pour expliquer ces périodes de flux plus importants: (i) une re-minéralisation plus intense (par exemple par une activité de broutage ou une activité microbienne plus importante) du matériel organique durant les périodes post-blooms pourrait accélérer le taux de dégradation des alcénones durant cette période et à contrario augmenter l'exportation des alcénones le long de la colonne d'eau au-delà de cette période (Conte *et al.*, 1992, 2001), (ii) une résistance accrue à la dégradation oxydative durant des périodes à faible productivité résultant de l'association physique des alcénones avec de l'argile ou du minéral biogénique (Keil & Hedges, 1993; Conte *et al.*, 2001), (iii) une forte stratification saisonnière pourrait entraîner une rétention des alcénones dans la zone euphotique où elles vont subir une dégradation, résultant probablement d'une activité bactérienne (Conte *et al.*, 1992). Bien qu'aucune preuve directe n'ait encore été apportée quant à une variation saisonnière du taux de dégradation des alcénones, ces mécanismes restent plausibles et devraient être pris en compte lors de l'interprétation d'études futures.

4.2.3.3. Les incohérences liées à des phénomènes environnementaux, autres que la température

Diverses expériences en laboratoire sur des souches de *E. huxleyi*, *G. oceanica* ou encore *I. galbana* ont montré que des facteurs autres que la température tels que la disponibilité en nutriments, la limitation de lumière ou le taux de croissance du phytoplancton pouvaient significativement altérer les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (Epstein *et al.*, 1998, 2001; Popp *et al.*, 1998a; Yamamoto *et al.*, 2000; Versteegh *et al.*, 2001; Prahel *et al.*, 2003, 2006b).

4.2.3.3.1. Le taux de croissance du phytoplancton

En 1998, Popp *et al.* (1998a) ont mis en évidence une corrélation entre les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et le taux de croissance d'*E. huxleyi* dans des cultures menées à température constante. Cette

corrélation semble toutefois variable en fonction de la calcification des cellules d'*E. huxleyi* (pas de modification de l' $U_{37}^{K'}$ pour les souches calcifiées). Néanmoins, ces auteurs ont conclu que la variation du ratio due à l'effet du taux de croissance restait trop faible pour avoir un impact significatif sur la détermination des paléotempératures à partir des alcénones. Mais un peu plus tard, Yamamoto *et al.* (2000), mettent à leur tour en évidence une relation significative entre l'indice $U_{37}^{K'}$ et les différentes phases de croissance des espèces *E. huxleyi* et *G. oceanica*. Les auteurs ont observé pour *E. huxleyi* une fluctuation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ allant de 0,50 à 0,68 (soit une variation de 0,18 correspondant à une différence de température de 5,1°C) et pour *G. oceanica* une fluctuation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ allant de 0,45 à 0,56 (soit une déviation de 0,11 correspondant à une différence de température de 3,1°C). L'ampleur des variations observées se sont révélées dépendre de l'espèce considérée.

4.2.3.3.2. Disponibilité en nutriments et limitation de lumière

Epstein *et al.* (1998) ont été les premiers à démontrer que les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ pouvaient varier en fonction de la disponibilité en nutriments. Plus tard, Prah *et al.* (2003), ont confirmé ces résultats préliminaires et montré que la disponibilité en lumière pouvait également avoir un impact non négligeable sur l' $U_{37}^{K'}$. En effet, lors d'expérimentation sur des cultures d'*E. huxleyi* placées à température constante (15°C), les auteurs ont pu observer qu'une carence nutritive entraînait une diminution significative de l' $U_{37}^{K'}$ de - 0,11 (correspondant à une diminution de température de 3,2°C). A l'inverse après 5 jours à l'obscurité, ces auteurs ont observé une augmentation significative de l' $U_{37}^{K'}$ de + 0,11. Epstein *et al.* (2001) ont également mis en évidence une modification des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (-0,035 et + 0,046 pour les souches d'*E. huxleyi* BT6 et 55a respectivement), durant des incubations à l'obscurité.

Des travaux sur *I. galbana* ont montré à leur tour, une relation entre les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et la disponibilité en nitrate, en phosphate et en lumière (Versteegh *et al.*, 2001). Les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ diminuaient significativement (équivalente à -6°C) avec une limitation de la lumière et de la concentration en phosphate alors que la limitation en azote ne semblait pas avoir d'effets (Versteegh *et al.*, 2001).

Plus récemment, Prah *et al.* (2006b) ont confirmé les résultats qu'ils avaient obtenus précédemment, à savoir que le contenu en alcénones chez *E. huxleyi* dépend fortement de

l'état physiologique des cellules. Là encore, un stress nutritif a conduit à une diminution de l' $U_{37}^{K'}$ (-0,05) alors qu'un stress prolongé à l'obscurité et une diminution d'intensité lumineuse ont résulté en une augmentation de l' $U_{37}^{K'}$ (+0,07).

4.2.3.4. Les incohérences liées à une variabilité spatiale et/ou temporelle de la synthèse des alcénones

D'une manière générale, il est admis que les alcénones enregistrent le signal des températures moyennes annuelles des eaux de surface (0-10m) car cela correspond à la zone où les haptophytes sont les plus abondants (Müller *et al.*, 1998). Cependant, cette supposition s'est révélée inexacte dans de nombreux cas (Cf. tableaux I-12 et I-13). Afin de bien interpréter les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$, il est important de maîtriser les variations spatiales et temporelles de production des alcénones par les haptophytes, ce qui permettrait de répondre à la question essentielle, qui est de savoir quelle est la température enregistrée par les alcénones? Une mauvaise interprétation de ces données pourrait induire des incohérences par rapport à la maSST attendue. Cependant, les études menées sur l'influence de telles variations sur les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ sont limitées (Prahl *et al.*, 1993; Sikes *et al.*, 1997; Ternois *et al.*, 1997; Bentaleb *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2007) et ne répondent pas à toutes les questions.

Par exemple, Bentaleb *et al.* (1999), ont démontré en étudiant du matériel particulaire en suspension à 5 et 30 m au nord-ouest de la Méditerranée, dans des conditions de thermocline bien définies, que les alcénones étaient essentiellement produites au maximum de chlorophylle (30 m) et que la température enregistrée par les alcénones en C_{37} correspondait aux températures des eaux mesurées à cette profondeur et non pas à celles des eaux de surface (5 m). Conte *et al.* (1992), ont montré que les températures calculées à partir de l'indice d'insaturation des alcénones ($U_{37}^{K'}$) dans l'océan Atlantique nord-est, correspondaient à la température des eaux de la zone euphotique durant la période de printemps (maximum de production et du flux des alcénones) plutôt que des maSSTs. Face aux incohérences observées en fonction des études, deux facteurs ne doivent pas être négligés : la profondeur et la saison à laquelle les alcénones vont être synthétisées par les haptophytes.

4.2.3.4.1. La profondeur de croissance des haptophytes

Les haptophytes sont des organismes photosynthétiques qui vivent par conséquent à l'intérieur de la zone euphotique. La profondeur de cette zone euphotique peut varier

d'environ 20 m dans les régions eutrophes à environ 120 m dans les régions oligotrophes (Morel & Berthon, 1989; Longhurst, 1993). Les prymnesiophytes ne croissent pas nécessairement à la surface de l'eau ou à la profondeur du maximum de chlorophylle comme le laissent supposer les premières études (Okada & Honjo, 1973; Honjo & Okada, 1974). Dans certaines régions à fortes thermoclines saisonnières ou d'upwellings, la profondeur de croissance des prymnesiophytes peut connaître des fluctuations notables (tableau I-12).

Tableau I-12. Récapitulatif de quelques exemples de profondeurs de production maximale des alcénones par les haptophytes en fonction des zones géographiques.

Zones géographiques	Profondeurs de production maximale d'alcénones	Auteurs
Atlantique nord-est	Zone euphotique	Conte <i>et al.</i> , 1992
Atlantique nord-ouest (mer des Sargasses)	zone euphotique supérieure (0-20 m). Au-dessus du maximum de chlorophylle	Conte <i>et al.</i> , 2001
Mer Méditerranée nord-ouest	30 m	Bentaleb <i>et al.</i> , 1999
Mer Méditerranée nord-ouest	30 m à l'automne et 50 m au printemps	Ternois <i>et al.</i> , 1996; Ternois <i>et al.</i> , 1997
Mer Méditerranée	30 m à l'automne et 50 m au printemps	Sicre <i>et al.</i> , 1999
Mer Noire	10 m . Au dessus de la profondeur de maximum de chlorophylle (30-40 m) et de la thermocline (20-25 m)	Freeman & Wakeham, 1992
Pacifique nord-est	Sub-surface du maximum de chlorophylle	Prahl <i>et al.</i> , 1993
Pacifique nord-ouest	Couche de surface de mélange	Prahl <i>et al.</i> , 2005
Pacifique nord-ouest	Thermocline (< 30 m)	Yamamoto <i>et al.</i> , 2007
Pacifique nord-ouest (Japon central)	Couche de surface de mélange (30 m), au dessus du maximum de chlorophylle (80m)	Sawada <i>et al.</i> , 1998
Pacifique moyennes latitudes (35°-19° N)	Thermocline	Ohkouchi <i>et al.</i> , 1999
Pacifique hautes (48°-40°N) et basses latitudes (10°N-2°S)	Surface de la couche de mélange	Ohkouchi <i>et al.</i> , 1999

4.2.3.4.2. La saison de croissance des haptophytes

L'abondance des haptophytes varie avec les saisons et en fonction des zones géographiques (tableau I-13). Cette variabilité s'expliquerait par l'influence des conditions locales océanographiques à caractéristiques vitales (nutriments, intensité lumineuse, températures, etc.) pour les haptophytes.

Tableau I-13. Récapitulatif de quelques exemples de périodes de blooms d'haptophytes productrices d'alcénones en fonction des zones géographiques. Les saisons indiquées en gras représentent les blooms principaux.

<u>Zones géographiques</u>	<u>Périodes de blooms</u>	<u>Auteurs</u>
Antarctique	Été	Sikes <i>et al.</i> , 1997
Atlantique nord (mer des Sargasses)	Fin de l'hiver - Printemps	Conte <i>et al.</i> , 2001
Atlantique nord-est	Printemps	Conte <i>et al.</i> , 1992
Atlantique nord-est	Fin Printemps (Avril à Juin)	Rosell-Melé <i>et al.</i> , 2000
Mer Baltique	Juillet et Août	Schulz <i>et al.</i> , 2000
Golfe du Maine (océan Atlantique)	Mi-Septembre	Prahl <i>et al.</i> , 2001
Océan Indien	Été Austral	Ternois <i>et al.</i> , 1998
Mer Méditerranée	Printemps et Automne	Ternois <i>et al.</i> , 1996
Mer Méditerranée	Printemps et Automne	Sicre <i>et al.</i> , 1999
Mer de Norvège	Printemps et Automne	Thomsen <i>et al.</i> , 1998
Pacifique nord-est	Fin de Printemps	Prahl <i>et al.</i> , 1993
Pacifique nord-ouest (est du Japon)	Printemps à Automne	Yamamoto <i>et al.</i> , 2007
Pacifique nord-ouest (japon central)	Printemps	Sawada <i>et al.</i> , 1998
Pacifique nord subtropical	Hiver et Automne ou début d'Été	Popp <i>et al.</i> , 2006
Pacifique équatorial central	Novembre, Février et Juin	Harada <i>et al.</i> , 2001
Pacifique sud (est Nouvelle-Zélande)	Printemps et fin Été/Automne	Sikes <i>et al.</i> , 2005

Globalement, les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ tendent à suivre les maSSTs (Müller *et al.*, 1998) mais cela peut être un artefact lié au fait que les températures de printemps (correspondant au bloom de printemps d'*E. huxleyi*) seraient très proches des températures annuelles moyennes dans de nombreuses régions géographiques. Aux hautes latitudes, les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ sont davantage corrélées aux températures des eaux d'été (Rosell-Melé *et al.* 1995 ; Sikes *et al.*, 1997, Ohkouchi *et al.* 1999) ou aux températures de la profondeur et de la saison des blooms (Harada *et al.* 2002, Yamamoto *et al.*, 2007). Ces données sont cohérentes si l'on considère que dans les hautes latitudes les blooms ont lieu durant les mois les plus chauds. Dans les régions tropicales ou subtropicales, la saisonnalité de la production phytoplanktonique serait moins marquée du fait de l'existence de deux blooms d'haptophytes survenant au cours de l'année, un au printemps et un à l'automne. La température obtenue à partir des alcénones pourrait être une moyenne de ces deux périodes, qui se rapprocherait des maSSTs (Müller *et al.*, 1998).

Bien qu'une apparente bonne corrélation de l' $U_{37}^{K'}$ avec les maSSTs soit observée dans les données globales, il est important de bien maîtriser les facteurs spatio-temporels de synthèse

des alcénones afin de mieux interpréter les études de températures dans des sites plus spécifiques. Les données concernant la saisonnalité et la profondeur à laquelle les alcénones sont synthétisées devraient être intégrées afin de vérifier si la température enregistrée par les alcénones traduit réellement la maSST ou si elle traduit la température des eaux à la profondeur de synthèse des alcénones moyennée à partir des blooms principaux.

4.2.3.5. Les incohérences liées à une mauvaise calibration (variations inter et intra-spécifiques)

Bien que la calibration de Prahl et Wakeham (1987), apparaisse globalement, valable à grande échelle dans les océans ouverts (Prahl *et al.*, 1988; Sikes *et al.*, 1991; Brassell, 1993; Müller *et al.*, 1998), de nombreuses études, notamment au nord de l'Atlantique (Conte *et al.*, 1992; Conte & Eglinton, 1993), en mer Noire (Freeman & Wakeham, 1992), dans l'Océan Antarctique (Sikes & Volkman, 1993), en mer Méditerranée (Ternois *et al.*, 1997; Cacho *et al.*, 1999b), en mer Baltique (Schulz *et al.*, 2000) et dans de nombreux lacs (Li *et al.*, 1996; Thiel *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2007), ont montré qu'une seule calibration n'était pas applicable à toutes les régions géographiques (Cf. tableaux I-4 et I-5). Cette nécessité d'attribuer différentes calibrations en fonction de la zone océanique considérée suggère une variabilité dans les espèces dominantes productrices d'alcénones (Sikes & Volkman, 1993; Cacho *et al.*, 1999b).

4.2.3.5.1. Une mauvaise calibration liée à une variabilité dans les espèces dominantes productrices d'alcénones en fonction des zones géographiques

Il est à présent acquis que la composition en alcénones varie en fonction des espèces d'haptophytes (Cf. Ch. I-2.2.1, tableau I-14) et au sein d'une même espèce. En effet, plusieurs auteurs ont observé une variabilité importante dans le profil en alcénones chez différentes souches d'*E. huxleyi*, *G. oceanica*, *I. galbana* et *C. lamellosa* (Marlowe *et al.*, 1984; Conte *et al.*, 1995, 1998; Volkman *et al.*, 1995; Sawada *et al.*, 1996; Rontani *et al.*, 2004).

Tableau I-14. Composition en alcénones chez différentes espèces d'haptophytes

Souches	Alcénones (en pourcentage relatif à la concentration totale en alcénones)										
	C _{37:4} Me	C _{37:3} Me	C _{37:2} Me	C _{38:4} Et	C _{38:3} Me	C _{38:3} Et	C _{38:2} Me	C _{38:2} Et	C _{39:3} Me	C _{39:3} Et	C _{39:2} Et
<i>Emiliania huxleyi</i> (92d) ^{1,b}	4,4	47,4	16,1	0,8	3,2	12,6	2,7	10,7		1,6	0,5
<i>Emiliania huxleyi</i> (EH2) ^{3,b}		43,2	13,3			33,6 ⁺				2,3	1,5
<i>Gephyrocapsa oceanica</i> (GO1) ^{3,b}		56	21			37,6 ⁺				0,3	5,4
<i>Chrysotila lamellosa</i> (353) ^{1,b}	29,9	54,1	3,9		6,1*		3,4*			2,6	
<i>Chrysotila lamellosa</i> (528) ^{1,b}	36,5	49,4	1,9		8,4		1,9			1,9	
<i>Chrysotila lamellosa</i> (HAP 17) ^{2,a}	37,6	29,7	3,3	10,9		9,7		5,7	2,7		
<i>Chrysotila lamellosa</i> (HAP17) ^{2,c}	5	44,8	11,3	1,6		13,1		21,7	1,4	tr	tr
<i>Chrysotila lamellosa</i> (353) ^{1,b}	29,9	54,1	3,9		6,1		3,4			2,6	
<i>Isochrysis galbana</i> (I) ^{1,b}	19,9	56,7	2,6		10,3		4,3			6,2	
<i>Isochrysis</i> Sp. (507) ^{1,b}	9,6	69,4	9,8		5,3		0,5			6,4	
<i>Isochrysis</i> sp. (506a) ^{1,b}		74,1	17		5,3		2,2			1,1	0,3

¹ Valeurs issues des travaux de Marlowe *et al.* (1984)

² Valeurs issues des travaux de Rontani *et al.* (2004)

³ Valeurs moyennées à partir de trois valeurs à 15°C issues des travaux de Sawada *et al.* (1996)

^{a,b,c} représentent les températures de culture des différentes souches testées, respectivement, 10, 15 et 20°C

* Isomères de C₃₈ non résolus sur le chromatogramme

⁺ Somme des différents isomères en C₃₈

Cette variabilité génétique inter et intraspécifique se retrouve dans la relation entre la température et le taux d'insaturation des alcénones ($U_{37}^{K'}$) (Conte *et al.*, 1995, 1998; Popp *et al.*, 1998a; Yamamoto *et al.*, 2000). Des expérimentations *in vitro*, visant à estimer la variation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ en fonction de la température du milieu de cultures de diverses espèces d'haptophytes productrices d'alcénones, ont permis de mettre en évidence que les calibrations reliant les températures de croissance et le taux d'insaturation des alcénones en C₃₇ pour les espèces *G. oceanica* ($U_{37}^{K'} = 0,049 T - 0,520$, Volkman *et al.*, 1995), *C. lamellosa* ($U_{37}^{K'} = 0,01 T + 0,0033$, Rontani *et al.*, 2004) ou encore *I. galbana* ($U_{37}^{K'} = 0,0167 T - 0,0607$, Versteegh *et al.*, 2001), déviaient significativement entre elles et avec la relation obtenue précédemment pour *E. huxleyi* ($U_{37}^{K'} = 0,034 T + 0,039$, Prahl *et al.*, 1988), Cf. tableau I-3.

Malgré le manque de preuves directes, une variation des espèces productrices d'alcénones dominantes (e.g. *E. huxleyi*, *G. oceanica*, *C. lamellosa*, *I. galbana*) en fonction des

environnements aquatiques, a de nombreuses fois été soupçonnée (Zink *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2005). Bien que dans les océans ouverts, *E. huxleyi* reste le coccolithophore le plus abondant et le plus ubiquiste des régions subpolaires aux régions tropicales, il ne semble cependant pas toujours la source dominante d'alcénones, essentiellement dans les environnements particuliers tels que les environnements lacustres, à faible salinité, les mers fermées, les mers et océans des hautes latitudes. (Cranwell, 1985; Cranwell *et al.*, 1988; Thiel *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2007). Or, les incohérences entre les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les SSTs sont souvent attribuables à ces environnements particuliers où la présence d'alcénones inhabituelles a pu être observée (forte proportion d'alcénones en $C_{37:4}$, $C_{36:2}$, $C_{35:2}$, etc.). Par exemple, Rosell-Melé (1998) a démontré que si l'alcénone en $C_{37:4}$ excède les 5% du sédiment de la mer du Nord, les températures calculées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ s'en trouvent systématiquement plus hautes que les SSTs. En 2003, Harada *et al.* (2003) ont entrepris de comparer l'efficacité de trois calibrations usuelles (Prahl *et al.*, 1988; Sikes *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1998) lors de l'analyse de matériel particulaire dans la mer de Béring (Océan Pacifique). La calibration de Sikes *et al.* (1997) mise au point dans l'Océan Antarctique a permis une meilleure adéquation entre les SSTs mesurées et les températures calculées à partir des alcénones. Ceci a été attribuée aux particularités communes (faible salinité et hautes concentration en $C_{37:4}$) dans ces deux zones.

La (ou les) source(s) de ces alcénones particulières, peu communes (comme les alcénones en $C_{36:2}$ et $C_{37:4}$), sont encore incertaines, diverses hypothèses restent plausibles, (i) certains génotypes d'*E. huxleyi* ou de *G. oceanica* les produiraient (Prahl *et al.*, 2006b; Rontani *et al.*, 2006c; Coolen *et al.*, 2009) ; (ii) des stress environnementaux (comme par exemple une faible ou forte salinité, les températures plus froides des hautes latitudes, etc.) induiraient leur production (Rosell-Melé, 1998; Schulz *et al.*, 2000; Rosell-Melé *et al.*, 2002; Sicre *et al.*, 2002; Harada *et al.*, 2003; Blanz *et al.*, 2005) ; (iii) d'autres espèces seraient impliquées dans leur production (Marlowe *et al.*, 1984, 1990; Xu *et al.*, 2001; Rontani & Volkman, 2005; Sun *et al.*, 2007; Jaraula *et al.*, 2010). Toutefois, en prenant en compte les résultats cités ci-dessus mettant en avant la variabilité intra et interspécifique dans la relation entre l' $U_{37}^{K'}$ et la température de croissance des haptophytes, l'hypothèse d'une prédominance d'autres haptophytes que *E. huxleyi* dans ces environnements particuliers semble acceptable.

4.2.3.5.2. Une mauvaise calibration liée à une variabilité dans les espèces dominantes productrices d'alcénones au cours des temps géologiques

L'implication d'autres haptophytes productrices d'alcénones ne se cantonne pas à une variabilité géographique mais peut avoir lieu également au cours des temps géologiques. En effet, si *E. huxleyi* devient l'haptophyte dominante ces derniers 70 000 ans (Thierstein *et al.*, 1977), au-delà de cette période la prédominance des diverses sources d'alcénones reste un mystère. Par conséquent, les calibrations actuelles adaptées spécifiquement à la réponse d'*E. huxleyi* sont potentiellement inappropriées. Bien que Villanueva *et al.* (2002) n'observe pas de concordance entre les variations dans les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les successions d'espèces d'haptophytes dominantes au cours des temps géologiques, le peu d'étude effectué sur ce sujet ne permet pas d'affirmer l'absence d'impact sur l'indice $U_{37}^{K'}$ lié aux changements d'espèces dominantes phytoplanctoniques. Par exemple, lors d'une étude de Fujine *et al.* (2006), la présence de l'alcénone inhabituelle en $C_{36:2}$ dans des sédiments provenant de la mer du Japon datant du Quaternaire, a été associée à des périodes de faible salinité des eaux de surface et à des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ anormalement hautes par rapport aux températures attendues durant ces périodes (163 à 129 000 ans et 68 à 9 000 ans). Ces résultats couplés aux résultats préalables de Xu *et al.* (2001; identification de l'alcénone en $C_{36:2}$ dans des sédiments prédatant l'invasion d'*E. huxleyi* en mer Noire) supposent que ces variations de l' $U_{37}^{K'}$ associé à une diminution de salinité pourraient résulter de la contribution d'autres espèces productrices d'alcénones, probablement adaptées à cette faible salinité.

Bien que la plupart des auteurs s'accordent à minimiser l'impact de ces autres espèces d'haptophytes sur l'interprétation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dans les sédiments (Müller *et al.*, 1998), il est cependant évident que selon l'espèce considérée, la relation entre le taux d'insaturation des alcénones et les SSTs est différente. L'incertitude liée à l'utilisation d'une calibration globale basée sur la réponse d'*E. huleyi* à un changement de température (Prah & Wakeham, 1987; Müller *et al.*, 1998) dans des environnements où d'autres espèces d'haptophytes peuvent être une source importante d'alcénones ne peut pas être ignorée (Volkman, 2000). Dans ce cas, les SST actuelles ou passées ne peuvent pas être estimées correctement à partir de calibrations globales (Thiel *et al.*, 1997).

Actuellement deux écoles de pensées s'affrontent. Celle qui accepte une calibration générale mondiale (Müller *et al.*, 1998) et interprète ensuite les anomalies dans les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ par d'autres phénomènes pouvant influencer sur l'indice $U_{37}^{K'}$ (problème analytique, variabilité spatiale ou temporelle de synthèse des alcénones, etc. Cf. Ch. I-4.2.3) et celle qui consiste à appliquer différentes calibrations en fonction de la zone géographique considérée (Cf. tableaux I-4 et I-5). Globalement les études portant sur l'utilisation des alcénones prônent l'établissement d'une calibration globale simple et statistiquement justifiable supportant l'utilisation de l' $U_{37}^{K'}$ comme paléomarqueur de la reconstruction des maSSTs.

5. La dégradation des alcénones

Outre les limites que nous venons de mettre en avant, les processus de diagenèse, de par leur importance dans le milieu naturel, ne sont pas à négliger. Comme toutes molécules, les alcénones sont soumises à l'action de processus de dégradation le long de la colonne d'eau et dans les sédiments après dépôt et peu d'études ont entrepris de déterminer si cette dégradation pouvait avoir un impact sur l'indice $U_{37}^{K'}$. Les premières hypothèses postulaient que du fait de leur structure particulière (grande longueur de chaîne, doubles liaisons de configuration *trans*, espacement des doubles liaisons par plusieurs groupement méthylènes), les alcénones devaient être *a priori* résistantes à la dégradation par rapport aux autres classes de lipides telles que les acides gras ou les stérols (Volkman *et al.*, 1980b). Cependant, de nombreux travaux (*in vitro* et *in situ*, en conditions oxygènes et anoxygènes) ont démontré que les alcénones subissent une dégradation plus ou moins importante durant la diagenèse (Prahl *et al.*, 1988, 1989; Mccaffrey *et al.*, 1990; Sikes *et al.*, 1991; Conte *et al.*, 1992, 1995; Freeman & Wakeham, 1992; Madureira *et al.*, 1995; Teece *et al.*, 1998; Müller & Fischer, 2001; Yamamoto *et al.*, 2007). La plupart des études ont confirmé que l' $U_{37}^{K'}$ n'était pas affecté durant la dégradation (Prahl *et al.*, 1989a; Mccaffrey *et al.*, 1990; Sikes *et al.*, 1991; Conte *et al.*, 1992; Madureira *et al.*, 1995; Teece *et al.*, 1998; Müller & Fischer, 2001; Yamamoto *et al.*, 2007), mais une augmentation de cet indice a parfois été observée (Freeman & Hayes, 1992; Freeman & Wakeham, 1992; Flügge, 1996; Hoefs *et al.*, 1998; Gong & Hollander, 1999) laissant supposer que la dégradation des alcénones pouvait être sélective dans certaines conditions. En effet, une dégradation préférentielle des alcénones les plus insaturées conduirait à une augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (la double liaison supplémentaire de

l'alcénone en C_{37:3} lui conférant une plus grande réactivité que l'alcénone en C_{37:2}) et ainsi à une mauvaise interprétation des paléotempératures enregistrées par les alcénones. Ce chapitre se propose de faire un point sur les différents processus de dégradation biotique et abiotique pouvant potentiellement agir sur les alcénones durant la diagenèse.

5.1. Les observations d'une dégradation sélective des alcénones exposées à l'oxygène

Hoefs *et al.* (1998) ont étudié la dégradation des alcénones dans des couches sédimentaires datant du Pliocène et du Miocène de la plaine abyssale de Madère. Une analyse comparative des couches oxiques vs. anoxiques a permis de montrer l'existence d'une dégradation préférentielle de l'alcénone en C_{37:3} dans les couches sédimentaires oxiques conduisant à des changements significatifs dans les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (jusqu'à +0,17 soit $\approx +5^{\circ}\text{C}$). Ces résultats ont toutefois été nuancés par les travaux de Grimalt *et al.* (2001) qui ont suggéré que leurs données pouvaient être erronées du fait des concentrations en alcénones très proches de la limite de détection (*Cf.* Ch. I-4.2.3.1). Cependant, un peu plus tard, les travaux de Gong et Hollander (1999), ont confirmé les résultats obtenus par Hoefs *et al.* (1998), en démontrant qu'une dégradation préférentielle de l'alcénone la plus insaturée (C_{37:3}) opérait dans les sédiments oxiques du Bassin de Santa Monica (Californie). Les températures ainsi obtenues à partir des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dans les sédiments oxiques étaient supérieures de 4°C par rapport à celles calculées dans les sédiments équivalents anoxiques.

Une dégradation plus importante de l'alcénone la plus insaturée (C_{37:3}) a été également suspectée par d'autres auteurs lors de l'observation de variations incohérentes des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dans (i) des échantillons sédimentaires et particulaires (Prahl *et al.*, 1988; Freeman & Wakeham, 1992) et (ii) des cultures en laboratoire d'*E. huxleyi* (Flügge, 1996). Plus récemment, Kim *et al.* (2009), ont soumis des sédiments marins provenant de Namibie (Afrique) à des conditions oxiques et anoxiques durant une année afin de vérifier si une dégradation sélective biotique et/ou abiotique opérait sur les paléomarqueurs $U_{37}^{K'}$ et TEX₈₆. Si l'indice TEX₈₆ (*Cf.* Ch. I-1.4.2) est resté constant dans les conditions oxiques et anoxiques, une augmentation de l'indice $U_{37}^{K'}$ a été observée dans les sédiments exposés à des conditions oxiques (+ 0,055 soit une augmentation de température de +1,6°C).

Ces différents résultats montrent bien qu'une dégradation sélective significative peut s'opérer dans des conditions oxiques et ainsi biaiser les interprétations des reconstructions de paléo-

températures basées sur la mesure de $U_{37}^{K'}$ (les estimations actuelles de différences de températures entre la dernière période glaciaire et inter-glaciaire étant de l'ordre de 1 à 3°C; Bard *et al.*, 1997). Il convient de faire un tri des phénomènes pouvant intervenir et provoquer potentiellement une dégradation plus importante de l'alcénone la plus insaturée.

5.2. Les processus de dégradation abiotique des alcénones

5.2.1. Les processus de photo-oxydation

5.2.1.1. Définition

Avant d'atteindre la surface des océans, le rayonnement solaire subit plusieurs phénomènes (diffusion, réflexion et absorption atmosphérique) qui vont atténuer son énergie. Seule la partie du spectre solaire correspondant aux radiations visibles et à une partie des radiations ultraviolettes (290 à 700 nm) atteint la surface des eaux (Fig. I-18).

Les réactions de photo-oxydation sont des réactions durant lesquelles un substrat moléculaire (A) va, en présence de lumière et d'oxygène moléculaire (O₂), être transformé en un produit d'addition AO₂.

Dans l'environnement marin, peu de composés organiques ont la capacité d'absorber des radiations supérieures à 290 nm, et par conséquent ces réactions de photo-oxydation sont restreintes à quelques molécules (composés carbonylés, tryptophane, thiamine, vitamines B12, pigments, acides gras poly-insaturés, etc.; Zafiriou *et al.*, 1984).

Les réactions de photo-oxydation intervenant dans le milieu naturel peuvent être classées en deux groupes :

1) Les réactions de photo-oxydation directe :

Elles consistent en la transformation photochimique des composés organiques directement excitable suite à l'absorption d'énergie électromagnétique de photons de longueurs d'ondes > 290 nm.

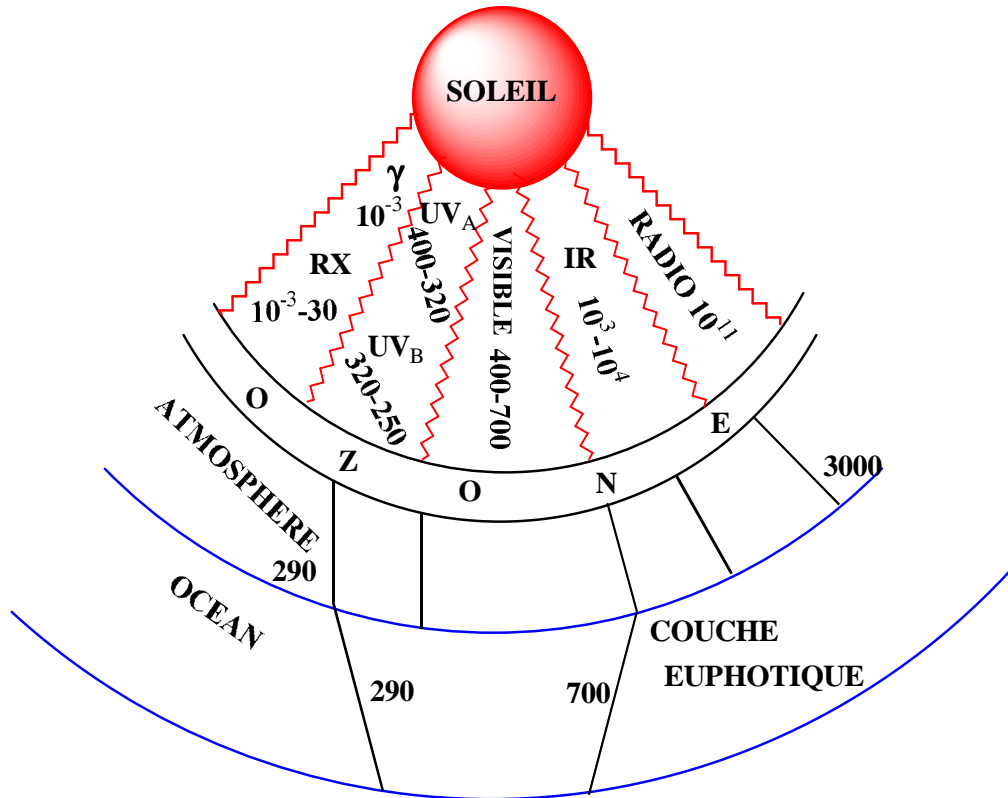


Fig. I-18. Partie du rayonnement solaire atteignant la surface des eaux (longueurs d'ondes en nm).

2) Les réactions de photo-oxydation indirectes ou induites :

Elles font intervenir des photosensibilisateurs, qui sont des composés à la fois capables d'absorber l'énergie électromagnétique à des longueurs d'ondes $> 290\text{nm}$ et de la transmettre à un autre substrat qui lui, ne peut pas être directement excité (absorption à des longueurs d'ondes $< 290\text{nm}$), comme par exemple l'oxygène moléculaire qui absorbe à des longueurs d'ondes proches de 200 nm . Les chlorophylles et les phaeopigments font partie des molécules à fort pouvoir photosensibilisateur (Foote, 1976). Ces photosensibilisateurs possèdent deux états électroniques, l'état singulet (1 sensibilisateur) et l'état triplet (3 sensibilisateur) (Foote, 1976). L'état triplet du sensibilisateur excité peut soit directement réagir avec un autre substrat (S) par transfert électronique ou transfert d'hydrogène pour former des radicaux (**réactions photo-induites de type I**, Fig. I-19), soit réagir avec l'oxygène (**réactions photo-induites de type II**, Fig. I-19). Dans ce dernier cas, le sensibilisateur transfère son énergie à une molécule d'oxygène (dont l'état électronique fondamental est un état triplet ($^3\text{O}_2$)), qui va ainsi passer dans la plupart des cas dans un état excité singulet ($^1\text{O}_2$) ou plus rarement former un ion superoxyde (O_2^-) (Foote, 1976).

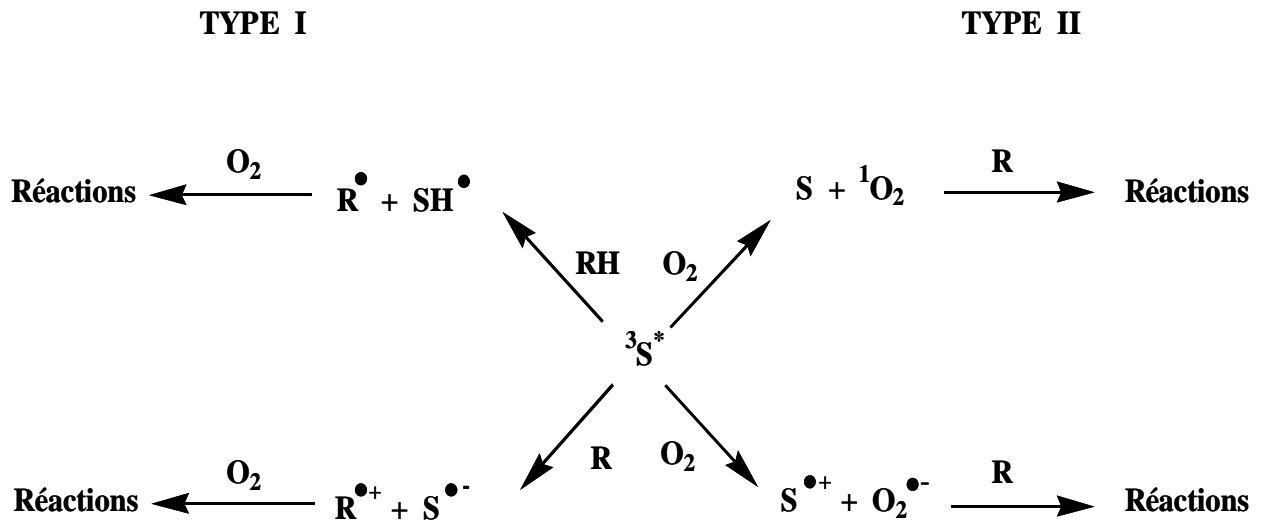


Fig. I-19. Réactions de photo-oxydation induites de type I et II à partir de l'état du triplet du photosensibilisateur (Rontani, 2001).

Lorsqu'une molécule de chlorophylle absorbe une quantité d'énergie lumineuse, elle passe à un état excité singulet (1Chl). Dans les cellules phytoplanctoniques vivantes (Fig. I-20), cette énergie d'excitation va essentiellement servir à promouvoir le flux des électrons des réactions photosynthétiques (Foote, 1976). Cependant dans moins de 0,1% des cas, l'état singulet de la chlorophylle (1Chl) passe par un état excité triplet (3Chl ; Knox & Dodge, 1985). Cet état excité de la chlorophylle peut non seulement avoir un effet délétère en induisant des réactions de photo-oxydation induites de type I (Knox & Dodge, 1985), mais peut aussi générer des espèces toxiques de l'oxygène telles que l'oxygène singulet (1O_2) et l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en réagissant avec l'oxygène moléculaire (3O_2 , réactions de photo-oxydation de type II). Afin de limiter ce stress oxydatif, de nombreux composés photoprotecteurs et antioxydants existent dans les chloroplastes. Parmi ces composés, les caroténoïdes (xanthophylles, β carotène) piègent la 3Chl et le 1O_2 par des mécanismes de transfert d'énergie très efficaces (Foote, 1976). Certaines vitamines comme l'acide ascorbique (vitamine C) ou les tocophérols (vitamines E), ainsi que certaines enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), peuvent aussi contribuer au piégeage des radicaux oxygénés formés (1O_2 ; $O_2^{\bullet-}$; HOO^\square ; Halliwell, 1987).

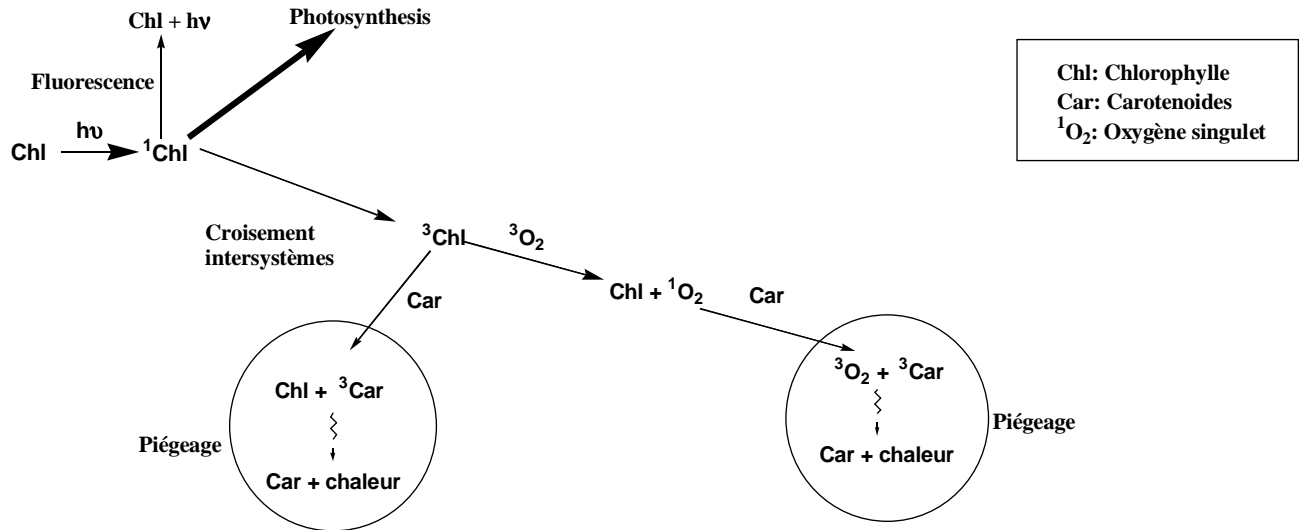


Fig. I-20. Devenir de l'énergie d'excitation de la chlorophylle dans des cellules phytoplanktoniques en bon état physiologique (Rontani, 2001).

A la sénescence des cellules phytoplanktoniques (Fig. I-21), l'énergie d'excitation des chlorophylles ne va plus être dissipée dans les réactions de photosynthèse ; il en résulte une augmentation du taux de production de ^3Chl et des formes réactives de l'oxygène ($^1\text{O}_2$; O_2^- , HOO^\cdot , H_2O_2), aboutissant à la saturation des mécanismes photoprotecteurs et à la photo-oxydation des composés cellulaires (Merzlyak & Hendry, 1994).

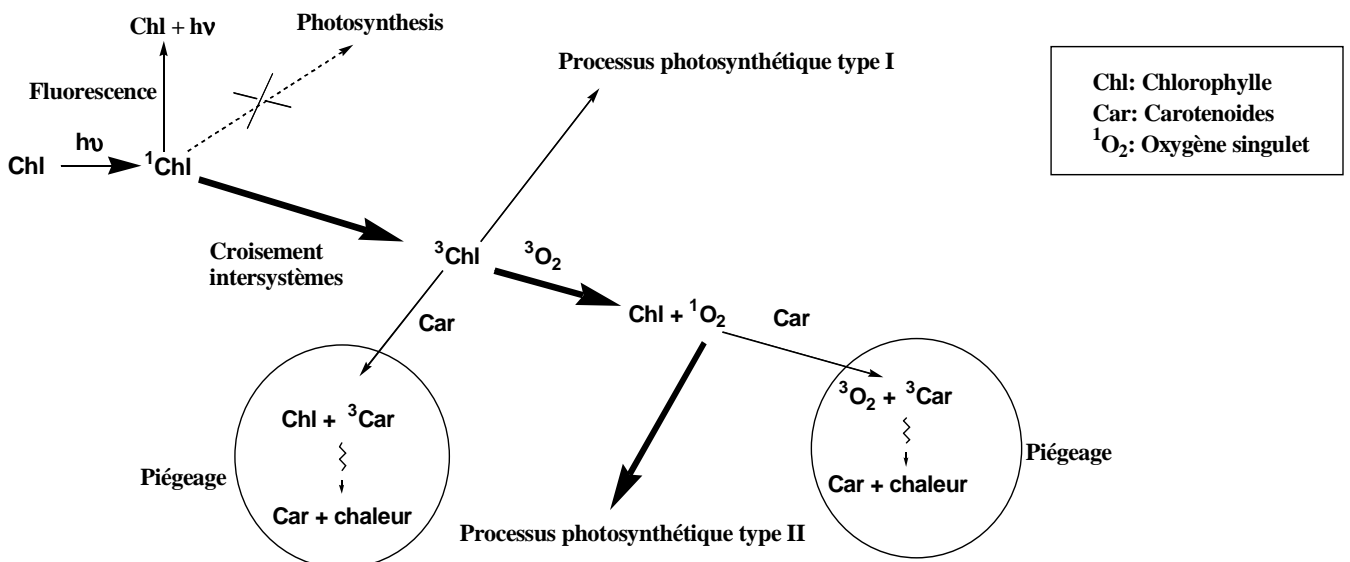


Fig. I-21. Devenir de l'énergie d'excitation de la chlorophylle dans des cellules phytoplanktoniques sénescentes (Rontani, 2001).

5.2.1.2. La dégradation des alcénones par photo-oxydation

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) possède un caractère électrophile très marqué et une durée de vie très courte (10^{-9} à 10^{-3} s). Lorsqu'il est produit, il va très rapidement réagir avec les composés insaturés, riches en électrons (Frimer, 1979). Par conséquent, dans des cellules phytoplanctoniques sénescents, les composés insaturés peuvent être facilement photo-oxydés, leur réactivité photochimique augmentant logiquement avec leur nombre d'insaturations (Rontani *et al.*, 1998). Autrement dit, $^1\text{O}_2$ peut réagir avec les doubles liaisons des alcénones durant la sénescence des haptophytes et avoir potentiellement un impact sur les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$.

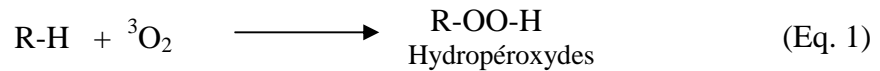
L'effet des processus de photo-oxydation sur les alcénones a été étudié par Rontani *et al.* en 1997. Ces auteurs ont suivi la dégradation des alcénones dans des cellules sénescents d'*E. huxleyi* exposées à la lumière ayant servi à leur croissance durant 21 jours. Une augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ de l'ordre de +0,04 a été observée. Bien que les processus de photo-oxydation conduisent à une dégradation importante de la plupart des lipides insaturés durant la sénescence du phytoplancton (Rontani, 2001, 2008), les alcénones sont apparues relativement récalcitrantes vis-à-vis de ces processus (Rontani *et al.*, 1997b; Christodoulou *et al.*, 2010). En effet, la dégradation photo-oxydative des alcénones apparaît beaucoup plus lente que celle des acides gras ayant le même degré d'insaturation (Rontani *et al.*, 1997b). Cette différence de réactivité a été attribuée à (i) la configuration *trans* des doubles liaisons des alcénones (Rechka & Maxwell, 1988), qui est de 7 à 10 fois moins réactive vis-à-vis de l'oxygène singulet que la configuration *cis* des acides gras (Hurst *et al.*, 1985) et (ii) à leur localisation dans la cellule (en dehors de la membrane cellulaire), entraînant une diminution des interactions entre l'oxygène singulet et les alcénones. Cette dernière hypothèse est bien en accord avec les résultats obtenus par Conte et Eglinton (1993) qui n'ont pas détecté d'alcénones dans les membranes d'*E. Huxleyi* et avec ceux plus récents d'Eltgroth *et al.* (2005) qui ont localisé les alcénones principalement dans des vésicules cytoplasmiques (Cf. Ch. I-2.4.).

Bien que limité (variation de l' $U_{37}^{K'}$ de + 0,04 $\approx 1^\circ\text{C}$), l'impact de la photo-oxydation sur les estimations de paléotempératures basées sur les alcénones ne doit pas être ignoré devant la précision actuelle nécessaire à l'évaluation des variations climatiques.

5.2.2. Les processus d'autoxydation

5.2.2.1. Définition

L'autoxydation est une réaction directe de l'oxygène avec des composés organiques, dans des conditions douces, aboutissant à la formation d'hydropéroxydes (Eq. 1). L'oxygène dont l'état fondamental est un état triplet ($^3\text{O}_2$), agit comme un di-radical libre, en raison de ses deux électrons non appariés sur ses deux orbitales externes qui lui confèrent la capacité d'accepter facilement des électrons célibataires.



Les processus d'autoxydation font intervenir des réactions radicalaires en chaîne et agissent principalement sur des composés possédant des insaturations ou des liaisons C-H de faibles énergies de liaison (position allylique, carbones tertiaires, position en α d'un atome d'oxygène, etc.). Ces réactions se déroulent en trois étapes : Une première **étape d'initiation** (Eq. 2, Fig. I-22) au cours de laquelle se forment les premiers radicaux libres résultant de la perte d'un atome d'hydrogène sous l'effet de la chaleur, de la lumière (UV) ou de la présence d'initiateurs de radicaux. Une deuxième **étape de propagation** (Eq. 3 et 4, Fig. I-22) dans laquelle les réactions s'enchaînent pour produire de nombreux radicaux libres qui finiront par se combiner pour former des composés non radicalaires durant **l'étape de terminaison** (Eq. 5, Fig. I-22, Frankel *et al.*, 1984)

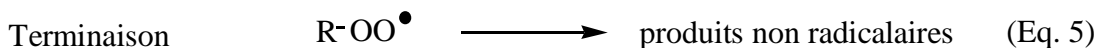
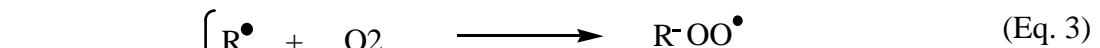
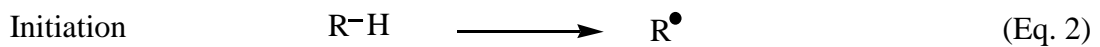
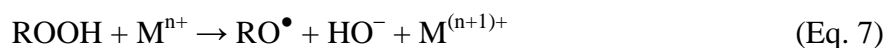


Fig. I-22. Les trois grandes étapes des réactions radicalaires en chaîne des processus d'autoxydation.

Dans les phytodétritus, l'induction des processus d'autoxydation des lipides semble résulter principalement du clivage homolytique des hydropéroxydes produits photochimiquement

(Girotti, 2001; Rontani *et al.*, 2003b), qui peut résulter de l'action des radiations UV (Christodoulou *et al.*, 2010) ou de la chaleur. Certains ions métalliques (Fe^{+3} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) peuvent également catalyser le clivage des hydroperoxydes (Pokorny, 1987; Schaich, 1992) et conduire à la formation de radicaux péroxyles (Eq. 6) et alkoxyles (Eq. 7).



5.2.2.2. La dégradation des alcénones par autoxydation

La faible réactivité photochimique des alcénones observée précédemment par Rontani *et al.* (1997), a été attribuée à la faible réactivité de la configuration *trans* de leurs doubles liaisons, moins réactive vis-à-vis de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) que la configuration *cis* (Hurst *et al.*, 1985). A l'inverse, les processus d'autoxydation radicalaires impliquent généralement des réactions d'addition sur une double liaison ou d'abstraction d'un hydrogène allylique. Ces processus peuvent, par conséquent, agir sur des doubles liaisons de configurations *cis* et *trans*, sans sélectivité notable (Stephani *et al.*, 1970). De ce fait, la réactivité autoxydative des alcénones devait vraisemblablement augmenter fortement avec leur nombre de doubles liaisons. En partant de ce principe, Rontani *et al.* (2006b), ont entrepris des travaux *in vitro*, visant à évaluer la sélectivité des processus autoxydatifs vis-à-vis des alcénones lors d'incubations à 55°C en présence de di-tert-butylnitroxyde (initiateur de radicaux) et de tert-butylhydroperoxyde. Les alcénones sont apparues plus sensibles à l'autoxydation que leurs analogues lipidiques tels que le phtyl acétate, le méthyl oléate et le cholestéryl acétate. De plus, une différence de réactivité considérable a pu être observée entre les alcénones en $\text{C}_{37:2}$ et $\text{C}_{37:3}$. Cette dégradation sélective a entraîné une augmentation significative de l' $U_{37}^{K'}$ (jusqu'à + 0,2 \approx 6°C) durant les incubations. L'autoxydation des alcénones semble faire intervenir principalement l'abstraction d'atomes d'hydrogène allyliques, les radicaux ainsi formés étant ensuite oxydés pour former des hydroperoxydes allyliques isomères, qui ont pu être identifiés (sous forme des diols insaturés correspondants) après réduction au NaBH_4 (Fig. I-23 et 24).

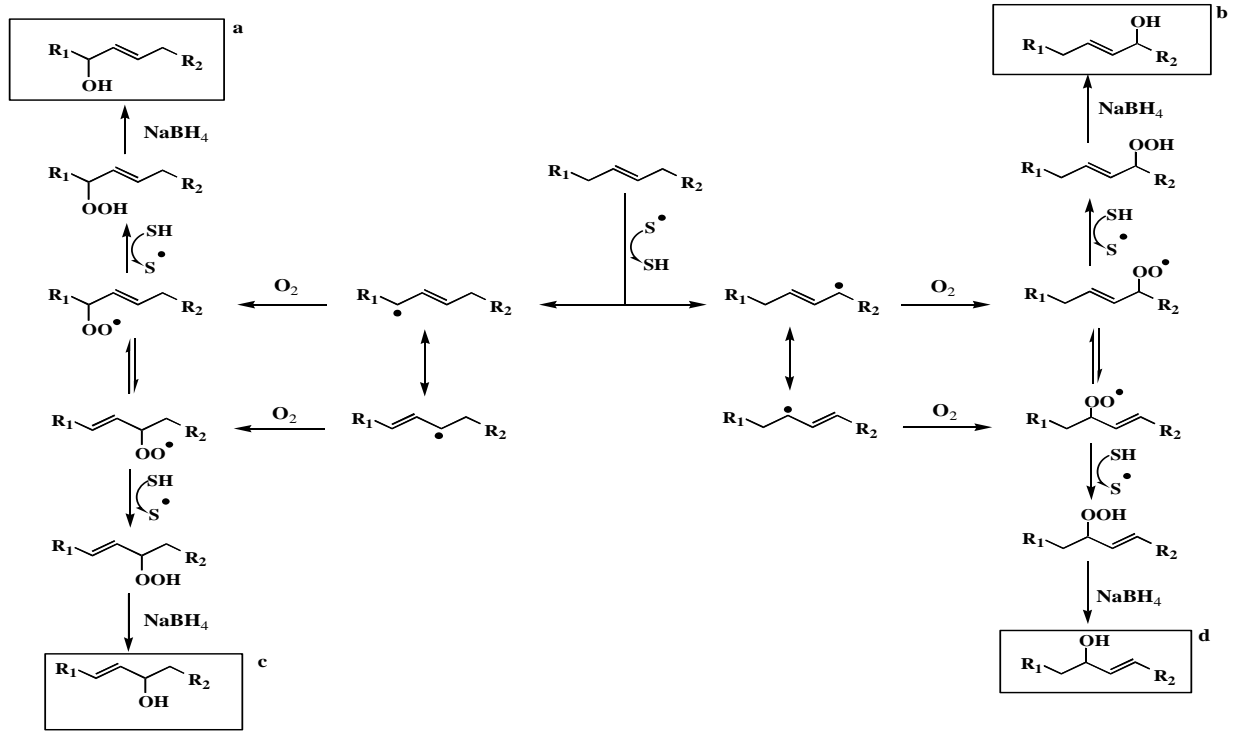


Fig. I-23. Mécanismes d'autoxydation des alcénones (Proposés par Rontani et al., 2006b), a,b,c et d représentent les différents produits d'autoxydation (diols insaturés) identifiés.

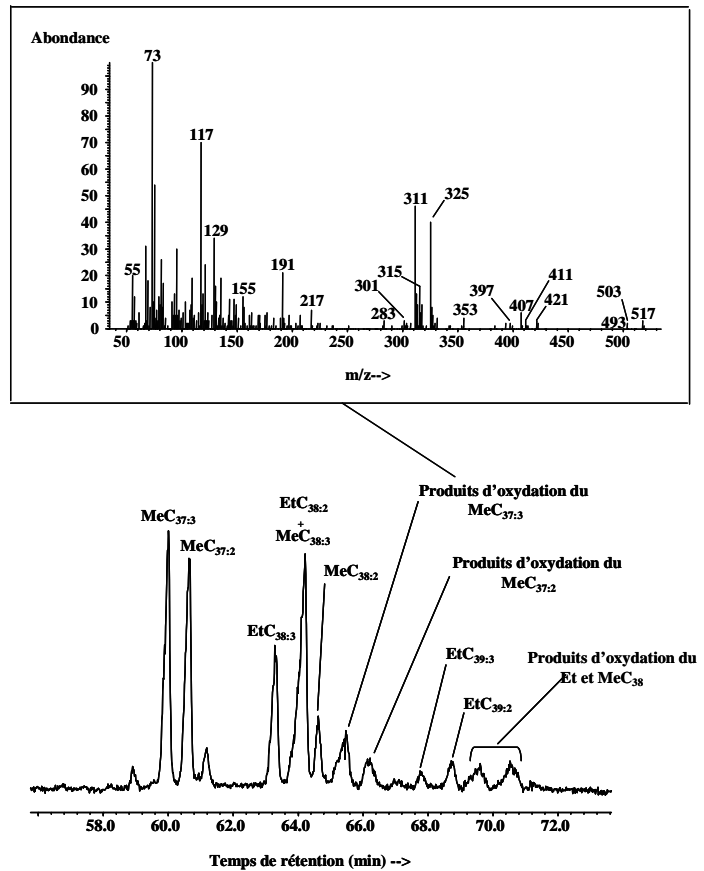
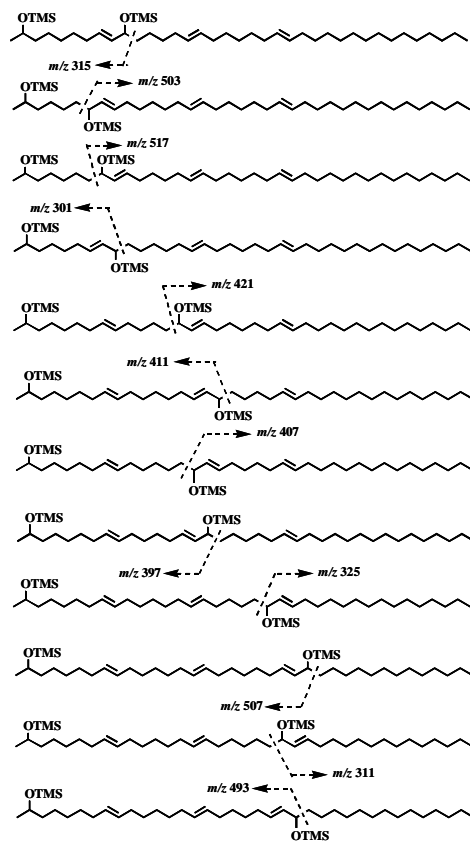


Fig. I-24. Caractérisation par CPG-SMEI des diols insaturés résultant de l'autoxydation de l'alcénone en C_{37:3} après silylation (Rontani et al., 2006b).

Par la suite, Rontani *et al.* (2007b) ont tenté de mettre en évidence une dégradation autoxydative des alcénones dans des cellules d'*E. huxleyi* sp. CS-57. Bien que les processus d'autoxydation et de photo-oxydation semblent liés, l'intervention de processus autoxydatifs n'était généralement pas observée lors de l'irradiation de cellules phytoplanctoniques sénescents *in vitro*. Ces auteurs ont attribué ceci au fait que le milieu f/2 employé dans les cultures algales contient d'importantes quantités d'EDTA (chélateur de métaux) qui limitent fortement les processus d'autoxydation en complexant les ions métalliques libres. Ce rôle anti-oxydant de l'EDTA a pu être fortement limité en diminuant le pH du milieu de culture (incubations effectuées sous atmosphère enrichie en CO₂). Dans ces conditions, Rontani *et al.* (2007b) ont pu induire l'apparition de réactions d'autoxydation dans des cellules d'*E. huxleyi*. Ainsi, ces auteurs ont pu détecter (après réduction au NaBH₄) des quantités significatives de diols résultant de la réduction des hydroperoxydes formés lors de l'autoxydation des alcénones (Rontani *et al.*, 2006b) et ont observé simultanément une augmentation notable du rapport d'insaturation des alcénones (allant de +0,07 à +0,15) induisant une surestimation de l'ordre de 2 à 4°C de la température de croissance des haptophytes. Ces observations ont démontré sans ambiguïté que les alcénones peuvent être fortement autoxydées dans les cellules phytoplanctoniques.

5.2.2.3. Des traceurs de l'autoxydation

Les hydroperoxydes allyliques isomères résultant de l'autoxydation des alcénones pouvaient constituer des indicateurs très utiles des biais résultant des processus autoxydatifs en milieu naturel. Cependant, du fait de la présence de doubles liaisons additionnelles potentiellement réactives, les hydroperoxyalcénones formées peuvent subir une/des réaction(s) d'oxydation supplémentaire(s), conduisant, après réduction au NaBH₄, à la formation de triols, tétraols ou pentaols, en fonction du degré d'insaturation des alcénones parentes. En raison de leur haut poids moléculaire et leur forte polarité, ces polyols présentent de très mauvaises caractéristiques chromatographiques qui limitent malheureusement considérablement leur utilisation en tant que traceurs de l'autoxydation des alcénones (Rontani *et al.*, 2007a).

Une solution alternative a été proposée par (Rontani *et al.*, 2006b; Rontani, 2008). Elle consiste à utiliser des produits d'autoxydation spécifiques d'autres lipides (*e.g.* stérols (Fig. I-25), acides gras mono-insaturés, chaîne phytyle de la chlorophylle) qui se trouvent généralement dans les échantillons naturels sous la forme d'hydroperoxydes (Rontani & Marchand, 2000; Marchand & Rontani, 2001). A partir du constat que les alcénones sont

autoxydées de manière plus rapide que les autres lipides, la détection de produits issus de l'autoxydation de ces autres lipides, associée à une augmentation significative des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$, suggèrerait fortement que les alcénones aient pu être également affectées par des phénomènes autoxydatifs sélectifs.

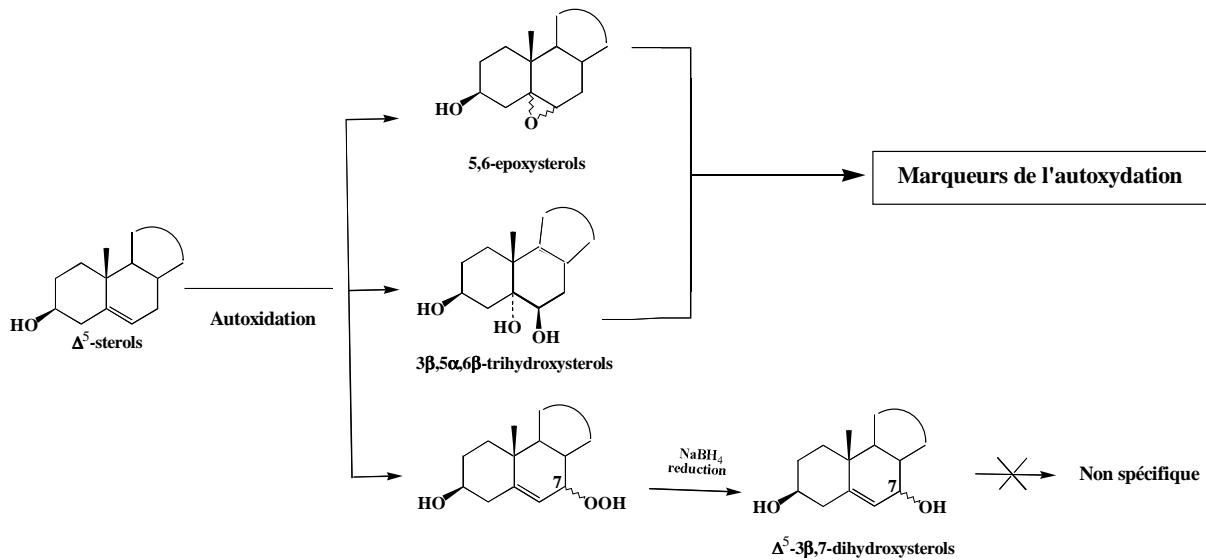


Fig. I-25. Exemple de produits d'autoxydation résultant de l'autoxydation des Δ^5 -stérols.

Afin de confirmer leurs résultats obtenus *in vitro*, Rontani *et al.* (2006b) ont analysés divers échantillons de matériel particulaire collectés par trappes à la station de DYFAMED (mer Ligure) durant l'été de 1998, où une forte autoxydation des lipides avaient préalablement été détectée (Marchand *et al.*, 2005). Les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ obtenues à partir de ces échantillons ont montré une variation importante allant de 0,4 à 0,51 durant une période de transition entre une période de bloom estival et une période post-bloom. Les températures équivalentes à ces valeurs d' $U_{37}^{K'}$ ont été déterminées à partir de la calibration de Ternois *et al.* (1997) préalablement mise au point dans cette zone géographique de la Méditerranée. Durant la période de bloom, les températures estimées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ (14,9 à 15,8°C) sont apparues relativement proches de la température de croissance des haptophytes mesurée (13,5°C à 15,0°C), alors que durant la période post-bloom, les températures estimées étaient significativement plus hautes (17,3 à 17,6°C). Or, de grandes quantités de produits d'autoxydation spécifiques d'acides gras mono-insaturés et de la chaîne phytyle de la chlorophylle ont été observées dans les échantillons collectés durant la période post-bloom mais pas dans ceux collectés durant le bloom. Par conséquent, l'augmentation de l'indice $U_{37}^{K'}$

observée durant la période post-bloom a été attribuée à une altération autoxydative sélective des alcénones, bien que l'absence de traceurs stables ne permette pas de le prouver directement. Plus récemment, Christodoulou *et al.* (2009) ont également observé une bonne corrélation entre les variations de l'indice $U_{37}^{K'}$ dans cette même zone et les teneurs en produits d'autoxydation de la chaîne phytyle de la chlorophylle.

Les processus de dégradation autoxydatifs ont longtemps été "ignorés" dans la littérature du fait du manque de traceurs appropriés. Des traceurs lipidiques spécifiques de ce processus de dégradation ont pu toutefois être proposés ces dernières années (pour une revue, voir Rontani, 2008). Des quantités importantes de ces composés ont pu être détectées récemment dans divers échantillons de matériel particulaire de la mer Méditerranée (Marchand *et al.*, 2005; Rontani *et al.*, 2006b, 2007a; Christodoulou *et al.*, 2009), mettant en évidence l'importance de ces processus de dégradation dans l'environnement marin. Il est donc essentiel de considérer dorénavant l'autoxydation comme un réel facteur pouvant influencer sur les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$.

5.3. Les processus de dégradation biotique des alcénones

5.3.1. La dégradation biotique sélective

Les premières études (Teece *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2004) postulant de la non sélectivité des processus de dégradation bactérienne vis à vis des alcénones mono- et di-insaturées (Cf. Ch. I-4.1.5.2) furent ébranlées par les travaux de Rontani *et al.* (2005a, 2008).

La première étude menée par Rontani *et al.* (2005), consistait à incuber des cellules d'*E. huxleyi* CS-57 avec des consortiums bactériens issus de tapis microbiens riches en alcénones provenant de Camargue (Rontani & Volkman, 2005) et de vérifier si les bactéries présentes dans ces tapis étaient capables de dégrader de manière sélective ou non les alcénones dans des conditions aérobies, dénitrifiantes et sulfato-réductrices. Dans des conditions aérobies, une grande variabilité de la sélectivité de la biodégradation des alcénones a été observée (augmentation des valeurs de l'indice $U_{37}^{K'}$ variant de 0 à +0.10 en fonction des incubations correspondant à des variations de température allant de 0 à +3°C). En conditions sulfato-réductrices, malgré une dégradation des alcénones plus lente que dans les conditions dénitrifiantes, une augmentation significative de l' $U_{37}^{K'}$ a pu être observée. Cette augmentation ne résultait pas d'une biodégradation sélective des alcénones, mais de l'intervention de

processus abiotique de stéréomutation (isomérisation *cis/trans* des doubles liaisons; Cf. Ch. I-5.4.). Enfin en conditions dénitrifiantes, aucune modifications significatives de l' $U_{37}^{K'}$ n'a pu être observée malgré une forte dégradation des alcénones confirmant les résultats de Teece *et al.* (1998), à savoir, la non sélectivité des processus de biodégradation anaérobies vis-à-vis des alcénones.

Afin de mieux comprendre pourquoi dans certains cas les processus de biodégradation aérobie se révélaient sélectifs et dans d'autres cas non sélectifs, d'autres travaux *in vitro* ont été entrepris par Rontani *et al.* en 2008. Quatre communautés bactériennes, isolées à partir de la souche *E. huxleyi* sp TWP1, avant et après différents traitements aux antibiotiques, ont permis d'étudier la biodégradation microbienne des alcénones dans des conditions contrôlées. En fonction de la communauté bactérienne incubée avec *E. huxleyi*, des résultats bien distincts ont été obtenus. Deux communautés (TAB et ATB3) dégradait de manière sélective les alcénones et deux autres communautés (ATB1 et ATB2) de manière non sélective. Au bout de 20 jours, la sélectivité a entraîné pour les communautés TAB et ATB3, une augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ correspondant à une augmentation de température de +2°C et +3,3°C respectivement. Ces résultats, qui ont montré clairement l'existence de bactéries aérobies capables de dégrader sélectivement et non sélectivement les alcénones, pourraient expliquer les résultats contradictoires obtenus dans la littérature (Teece *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2004; Rontani *et al.*, 2005a, 2008).

5.3.2. Les différentes voies métaboliques de dégradation des alcénones

L'impact des processus de biodégradation aérobie sur le taux d'insaturation des alcénones ($U_{37}^{K'}$) semble donc être dépendant des souches bactériennes en présence des haptophytes. Ceci pourrait résulter de l'utilisation par les bactéries aérobies de voies métaboliques différentes lors de la dégradation des alcénones :

- **Voie A** - Oxydation terminale du groupe méthyle (Watkinson, 1978).
- **Voie B** - Oxydation du groupement méthyle cétonique suivie d'une décarboxylation de l' α -cetoacide ainsi formé (Gillan *et al.*, 1983).

- **Voie C** - Oxydation enzymatique du groupe cétonique en ester, analogue à l'oxydation de Baeyer-Villiger avec les peracides (Britton *et al.*, 1974), suivie d'une hydrolyse de l'ester en un alcool primaire et en acide acétique.
- **Voie D** - Clivage oxydatif des doubles liaisons (Watkinson, 1978) avec formation d'époxydes.
- **Voie E** - Oxydation directe des doubles liaisons par une dioxygénase.
- **Voie F** - Addition d'eau catalysée par une hydratase (Seo *et al.*, 1981) suivie d'une déhydrogénation et d'une carboxylation.

Les différents composés ainsi formés seraient ensuite assimilés via des séquences de β -oxydation.

Dans le cas où les bactéries utiliseraient une des trois voies métaboliques A, B et C pour dégrader les alcénones (Fig. I-26), la position de la double liaison dans la chaîne alkyle ne constitue pas un blocage métabolique pour les réactions de β -oxydation du fait de la présence d'isomérase 2,3-enoyl-CoA chez de nombreuses bactéries (Ratledge, 1994). Par conséquent, la présence ou l'absence d'une double liaison supplémentaire dans la chaîne des alcénones ne doit avoir aucun effet sur la vitesse d'assimilation des alcénones et la dégradation de ces composés doit être non sélective (cas des communautés ATB1, ATB2 (Rontani *et al.*, 2008), de certaines incubations de Rontani *et al.* (2005) et des expériences de Teece *et al.* (1998)).

En revanche, les bactéries capables de dégrader sélectivement les alcénones (cas des communautés TAB et ATB3 (Rontani *et al.*, 2008) et de certaines incubations de Rontani *et al.* (2005)) doivent utiliser les voies métaboliques D, E ou F, qui font intervenir une attaque au niveau des doubles liaisons des alcénones (Fig. I-27). Dans ces cas, la présence d'une double liaison additionnelle a un impact important sur la vitesse d'assimilation. La détection d'époxyalcénones (Fig. I-28) dans les cultures où une dégradation sélective des alcénones a été observée (TAB et ATB3), semble indiquer que la voie métabolique agissant sur les doubles liaisons des alcénones la plus probable est la voie D. Cependant une intervention des voies métaboliques E et F ne peut être totalement exclue.

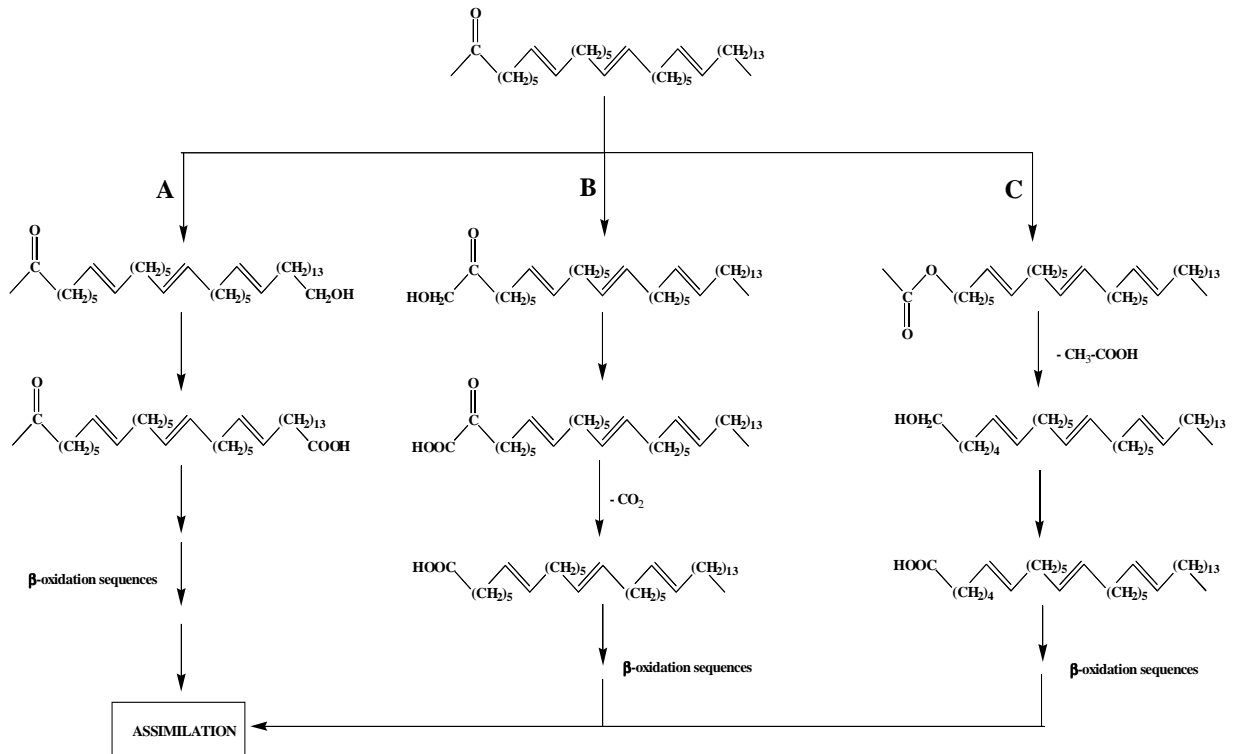


Fig. I-26. Voies métaboliques potentiellement impliquées lors de la dégradation bactérienne aérobie non sélective des alcénones: attaque des groupements méthyles et cétoniques (Rontani et al., 2008).

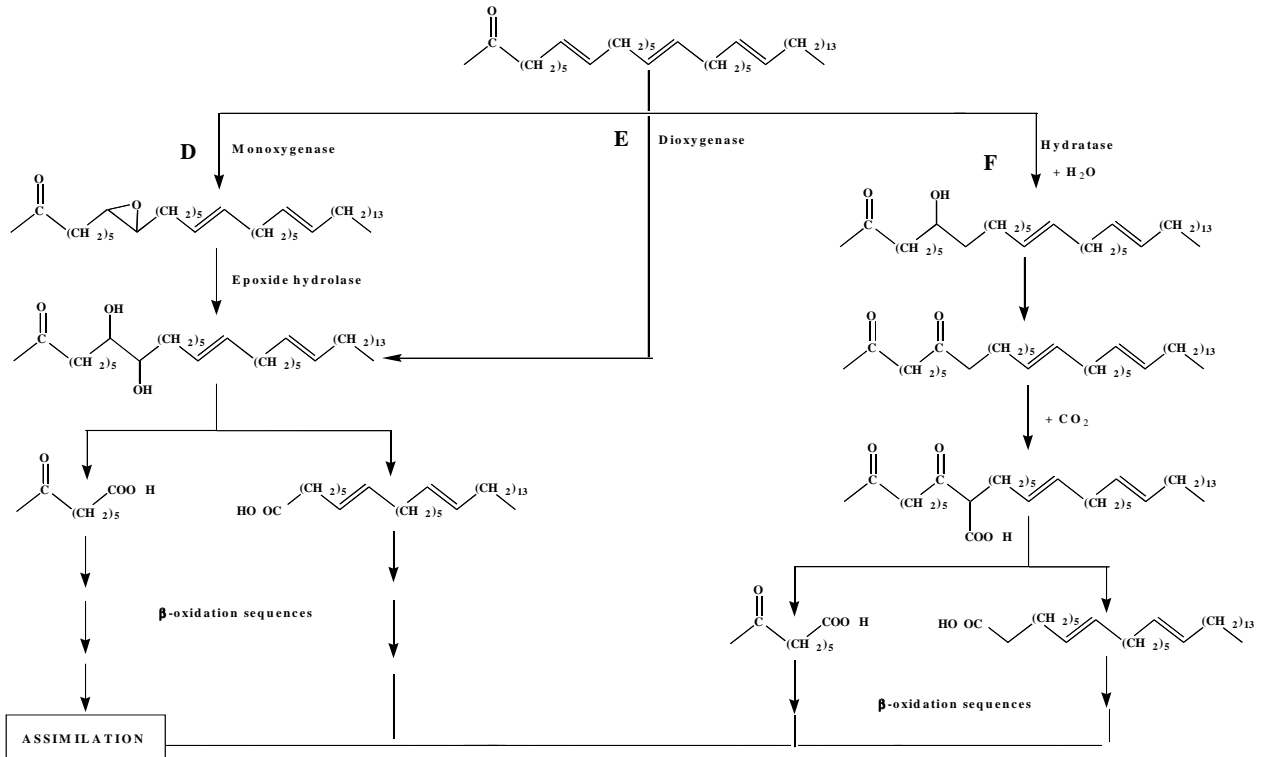


Fig. I-27. Voies métaboliques potentiellement impliquées lors de la dégradation bactérienne aérobie sélective des alcénones: attaque au niveau des doubles liaisons (Rontani et al., 2008).

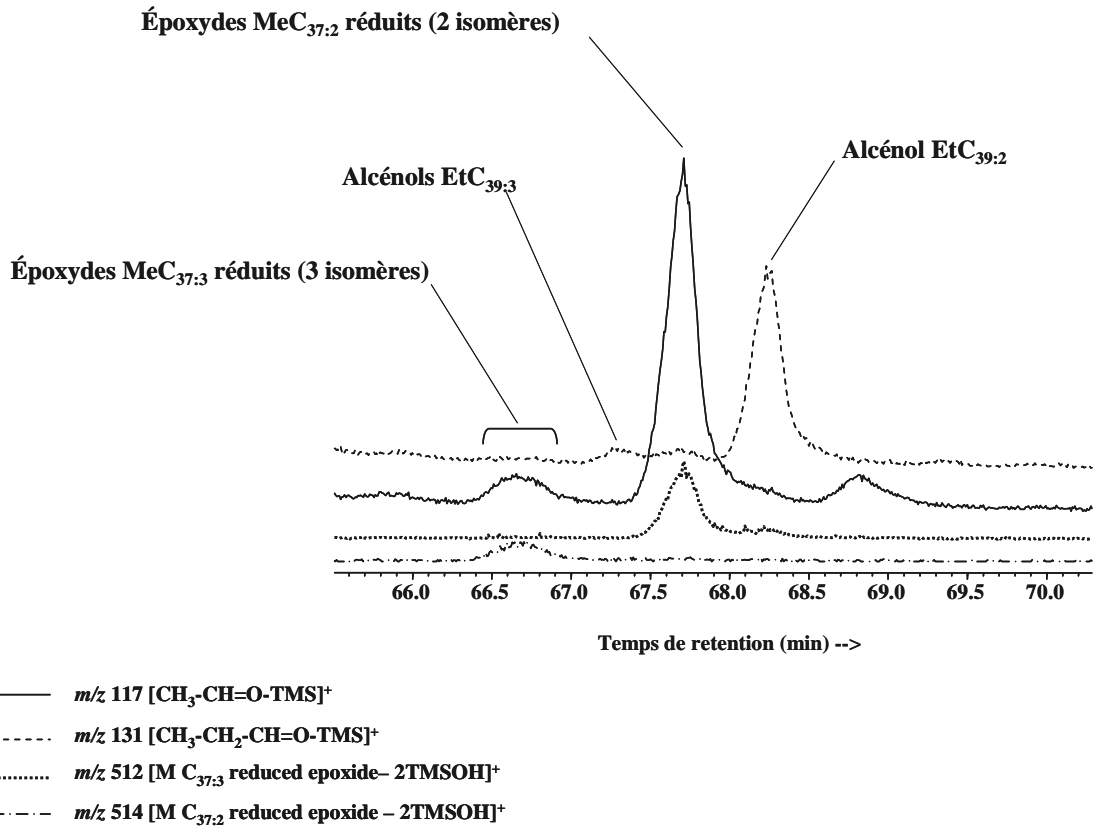


Fig. I-28. Chromatogramme partiel d'un extrait lipidique total réduit au NaBH_4 et silylé, montrant la présence d'époxyalcénones après incubation de la souche *E. huxleyi* TWP1 avec la communauté bactérienne ATB3 durant 20 jours.

5.3.3. Les traceurs de la dégradation bactérienne sélective des alcénones

L'époxydation des doubles liaisons par des bactéries aérobies est un processus bien connu. Il est induit par des mono-oxygénases cytochrome P-450-dépendantes. Ces enzymes peuvent produire des époxydes à partir d'une large gamme de substrats lipophiles tels que les *n*-alcènes (Klug & Markovetz, 1968; Hartmans *et al.*, 1989a; Soltani *et al.*, 2004), les terpènes (Duetz *et al.*, 2003), les acides gras insaturés (Ratledge, 1994) et les styrènes (Hartmans *et al.*, 1989b). Les enzymes impliquées dans la dégradation microbienne des époxydes sont nombreuses, incluant des déshydrogénases, des lyases, des carboxylases, des glutathione S-transférases, des isomérases et des hydrolases (van der Werf *et al.*, 1998). Parmi ces enzymes, les époxydes hydrolases, qui catalysent l'addition d'une molécule d'eau sur un époxyde pour former le diol correspondant, ont été bien étudiées et semblent être très répandues chez les bactéries (Michaels *et al.*, 1980; van der Werf *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2005). La voie métabolique présentée dans la figure I-29 a été proposée par Rontani *et al.* (2008) pour expliquer la dégradation bactérienne des alcénones via l'époxydation initiale de leurs doubles

liaisons. Ce processus fait intervenir l'hydrolyse de l'époxyde en diol correspondant suivie d'un clivage oxydatif. Le cétoacide et les acides ainsi formés sont ensuite totalement assimilés via des séquences de β -oxydation.

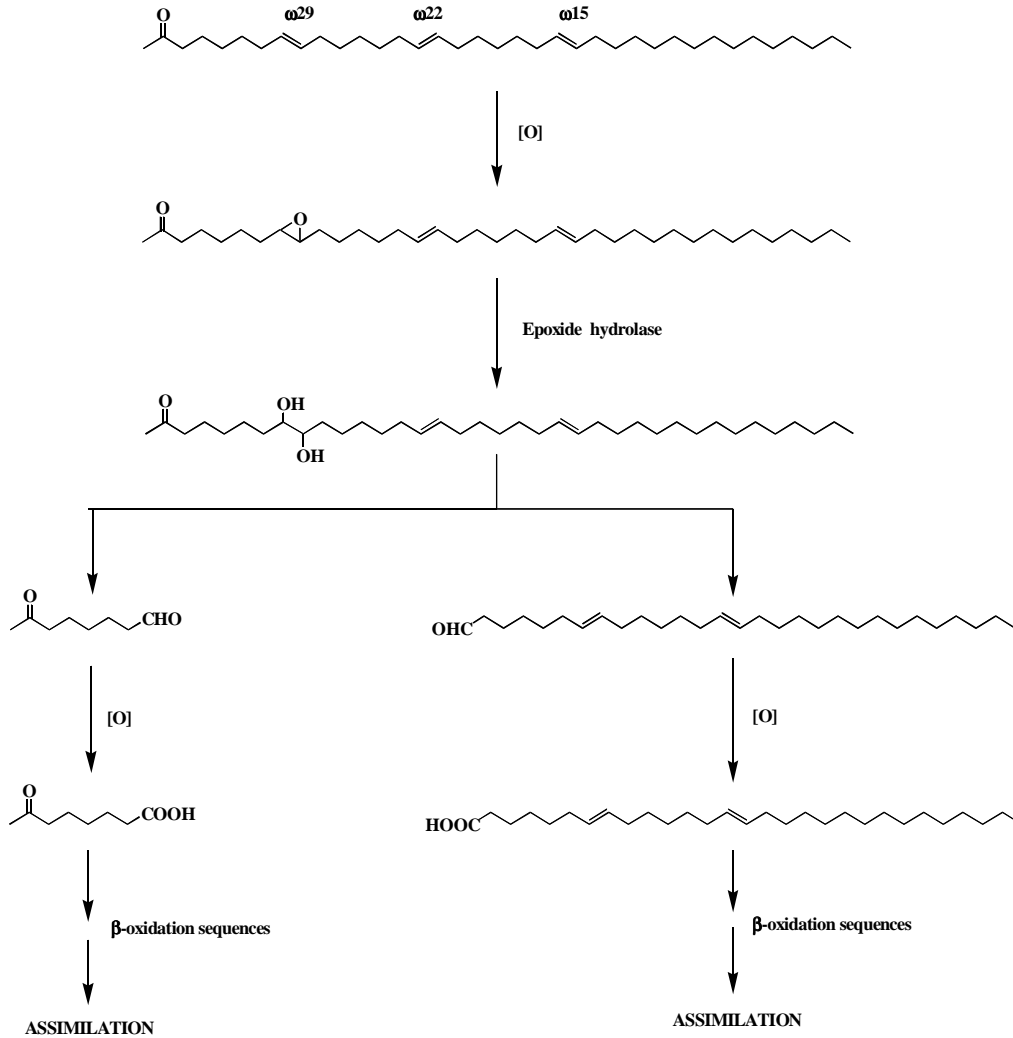


Fig. I-29. Voie métabolique proposée pour la dégradation de l'alcénone en $C_{37:3}$ impliquant l'époxydation initiale de la double liaison en position ω_{29} (Rontani *et al.*, 2008).

Outre la sélectivité évidente résultant de la présence d'une double liaison supplémentaire dans l'alcénone tri-insaturée ($C_{37:3}$) lui conférant une réactivité 1,5 fois supérieure à celle de l'alcénone en $C_{37:2}$, une sélectivité supplémentaire s'ajoute du fait d'une plus grande affinité de la monooxygénase (induisant les processus d'époxydation de la double liaison) vis-à-vis de la double liaison en position ω_{29} , qui n'est présente que dans l'alcénone en $C_{37:3}$. En effet, Rontani *et al.* (2008) ont pu montrer que lors de la biodégradation des alcénones par la communauté bactérienne ATB3, le pourcentage d'attaque des doubles liaisons en positions ω_{15} , ω_{22} et ω_{29} était respectivement de 22%, 32%, et 46%.

D'autres produits métaboliques de la dégradation des alcénones ont également été mis en évidence lors de ces incubations bactériennes en présence d'alcénones. C'est le cas notamment d'alcénols (Rontani *et al.*, 2008), dont la formation a été attribuée à une réduction bactérienne des alcénones, résultant probablement de l'activité non spécifique d'une déshydrogénase-hydrogénase (Platen & Schink, 1989). Ce processus pourrait être une source potentielle de ces composés dans l'environnement (Rontani & Volkman, 2005). De petites quantités d'alcénones en méthyle C₃₇ et éthyle C₃₈ mono-insaturées ont également été produites dans des cultures de la communauté bactérienne ATB3 (Rontani *et al.*, 2008). L'examen de la position de la double liaison de ces composés a montré qu'elle était située en ω 15 ou ω 22, positions bien distinctes de celle des alcénones mono-insaturées préalablement identifiées chez différents haptophytes (Rontani *et al.*, 2001) et en mer Noire (Xu *et al.*, 2001; Rontani *et al.*, 2006c), qui possédaient une double liaison en position ω 17 (Rontani *et al.*, 2001). La formation de ces composés lors des incubations avec la communauté ATB3 a donc été attribuée à la biohydrogénation d'une des doubles liaisons de l'alcénone correspondante di-insaturée (ω 15,22). Si l'intervention de tels processus dans le milieu naturel venait à être démontrée, une biohydrogénation des alcénones tri-insaturées en alcénones di-insaturées serait alors envisageable et aurait des conséquences dramatiques pour les estimations des paléotempératures basées sur les alcénones. La présence d'alcénones mono-insaturées constitue un traceur potentiel de l'intervention de ces réactions de biohydrogénation. Le fait que ces composés n'ont été détectés jusqu'ici qu'en très faibles proportions (par rapport aux alcénones di- et tri-insaturées, Rontani *et al.*, 2001, 2006c; Xu *et al.*, 2001) suggère toutefois que ces processus ne devraient pas intervenir de manière significative dans l'environnement marin.

En fonction des communautés bactériennes considérées, une biodégradation aérobie sélective peut induire un biais significatif dans les reconstructions de paléotempératures à partir des alcénones. Les époxyalcénones résultant de l'époxydation bactérienne de la double liaison des alcénones constituent des traceurs potentiels des processus de biodégradation sélective *in situ*. Ces composés présentent cependant les mêmes inconvénients que leurs alcénones parentes lors des analyses en CPG-SMEI, c'est-à-dire l'absence d'ions suffisamment spécifiques et intenses pour pouvoir être utilisés en mode SIM (Cf. Ch. I-2.5). Comme pour les alcénones, leur détection est facilitée par une réduction au NaBH₄ suivie d'une silylation permettant une quantification en mode SIM de leurs diols correspondants silylés (Rontani *et al.*, 2001).

5.4. Les processus de stéréomutation

Les processus de stéréomutation (isomérisation *cis/trans* des doubles liaisons) ont été observés par de nombreux auteurs lors de l'action de radicaux thiyles ($R-S\cdot$) sur des acides gras (Sgoutas & Kummerow, 1969; Niehaus, 1974; Urbach & Rando, 1994; Shih *et al.*, 1997; Ferreri *et al.*, 2004). L'attaque de la double liaison par le radical thiyle conduit à la formation de radicaux alkyles isomères intermédiaires, très instables, qui vont: (a) soit réagir par β -élimination et régénérer le radical thiyle et un mélange d'isomères de la molécule d'origine (stéréomutation), (b) soit subir des réactions d'addition d'atomes d'hydrogène conduisant à la formation de thioethers isomères (processus mineur par rapport à la stéréomutation). La figure I-30 ci-dessous décrit ces différents mécanismes.

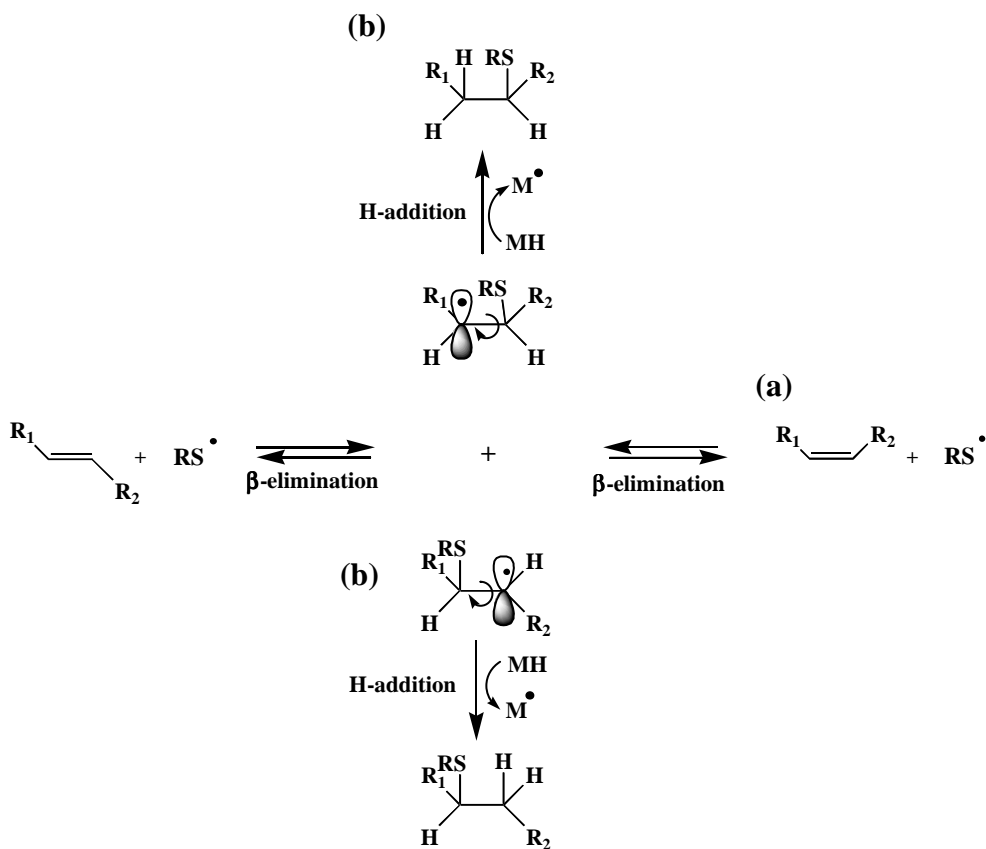


Fig. I-30. Réaction des radicaux thiyles avec les doubles liaisons des alcénonnes (Rontani *et al.*, 2006a).

Comme nous l'avons vu précédemment, la structure générale des alcénonnes est inhabituelle. En particulier, la configuration de leurs doubles liaisons qui est *trans* (*E*) (Rechka & Maxwell, 1988) contrairement à la configuration plus commune en *cis* (*Z*) de la plupart des lipides insaturés. L'observation d'alcénonnes inhabituelles *cis/trans* (révélant l'existence de processus

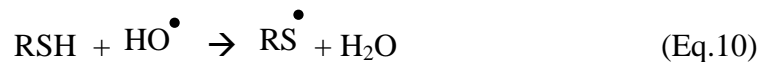
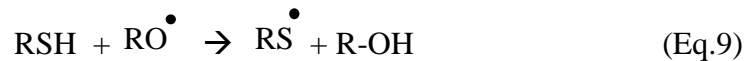
de stéréomutation des alcénones), lors d'incubations bactériennes sur des cellules d'*E. huxleyi*, dans des conditions oxiques et sulfato-réductrices (Rontani *et al.*, 2005a, Cf. Ch. I-5.3.1.), implique un rôle potentiel de ces processus dans les biais de l'indice $U_{37}^{K'}$ observés. Rontani *et al.* (2006a), se sont proposés d'étudier ces phénomènes de stéréomutation des alcénones en essayant (i) de déterminer les conditions environnementales favorisant leur intervention, (ii) d'évaluer leur impact potentiel sur les paléotempératures mesurées à partir de l'indice $U_{37}^{K'}$ et (ii) d'estimer leur importance dans l'environnement marin.

5.4.1. Formation des radicaux thiyles

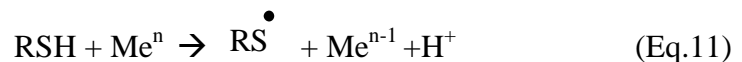
Dans le milieu naturel la formation de radicaux thiyles peut résulter:

1. Du clivage homolytique d'un thiol (le plus souvent le méthanthiol), qui peut être initié par :

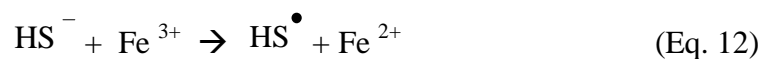
- Des radicaux peroxydes et hydroxydes, provenant de la décomposition homolytique d'hydropéroxydes d'origine photochimique ou autoxydative (Eqs. 8-10), qui sont souvent présents dans les cellules phytoplanctoniques sénescents (Rontani, 2001; Rontani *et al.*, 2003b; Cf. Ch. I-5.2).



- La présence d'ions métalliques dans l'eau de mer et les sédiments (Eq. 11).



2. De l'oxydation des ions thiolates (produits durant la réduction des sulfates) par des ions métalliques, tels que Fe^{3+} (Wlodek, 2002) (Eq. 12).



5.4.2. La stéréomutation des alcénones

Lors de leur analyse en CPG-SMEI, les alcénones "stéréomutées" (*cis/trans* ou *cis/cis*) présentent des spectres de masse identiques mais des temps de rétention plus courts que les alcénones parentes dont la configuration des doubles liaisons est en totalité *trans* (Rontani *et al.*, 2006a). Ces temps de rétention bien distincts permettent de les repérer sur un chromatogramme (Fig. I-31). L'incubation des alcénones en présence de radicaux thiyles (incubation en présence d'un mélange de méthanol et d'éthanethiol, Cf. Ch. I-5.4.1) a conduit à une stéréomutation très rapide (4-5 jours d'incubation) des alcénones, aboutissant à l'équilibre à la formation d'un mélange d'approximativement 80% d'alcénones intactes (avec toutes leurs doubles liaisons *trans*) et 20% d'alcénones "stéréomutées" possédant des doubles liaisons *cis et trans* dans la molécule (Fig. I-31, A et B). Afin de compléter ces observations, les auteurs (Rontani *et al.*, 2006a) ont incubé en présence d'éthanethiol la souche *E. huxleyi* CS-57 dans de l'eau de mer. Les résultats obtenus (Fig. I-31, C et D) ont montré que la stéréomutation des alcénones agissait également dans ces conditions.

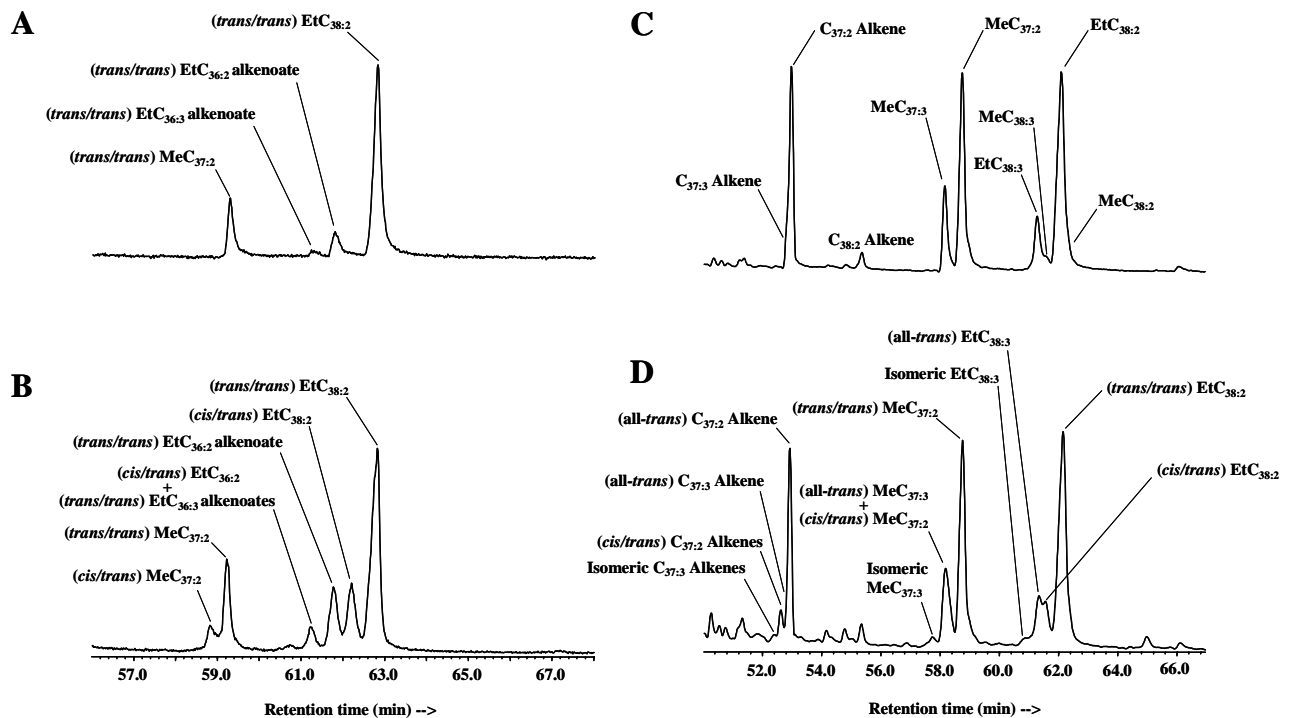


Fig. I-31. Chromatogrammes partiels en ions totaux (TIC) montrant la distribution d'alcénones intactes et stéréomutées dans une fraction d'alcénones di-insaturées purifiée à partir de cellules d'*E. huxleyi* CS-57 avant (A) et après (B) incubation de 7 jours dans un mélange méthanol/éthanethiol et dans l'extrait lipidique total de cellules mortes de la même souche avant (C) et après (D) incubation de 10 jours dans de l'eau de mer contenant de l'éthanethiol (Rontani *et al.*, 2006c).

Les processus de stéréomutation agissant au niveau des doubles liaisons, la vitesse de la réaction augmente proportionnellement avec le nombre de doubles liaisons présentes dans la molécule insaturée. Du fait de sa double liaison supplémentaire, l'alcénone en C_{37:3} va donc réagir approximativement 1.5 fois plus rapidement que l'alcénone en C_{37:2}, induisant une augmentation non négligeable de l' $U_{37}^{K'}$ (+ 0,05; Rontani *et al.*, 2006a).

5.4.3. Induction des processus de stéréomutation en milieu naturel

Le méthane-thiol, dont le clivage homolytique conduit à la formation des radicaux thiyles nécessaires à la stéréomutation, peut être formé dans l'environnement marin de plusieurs manières:

- Par dégradation microbienne des amino-acides contenant du soufre, telle que la méthionine, dans des conditions aérobies et anaérobies (Ferchichi *et al.*, 1986; Kiene & Visscher, 1987).
- Par méthylation de sulfures par certaines bactéries. Cette méthylation, impliquant la (S,S)-adenosylmethionine fait intervenir la thiol méthyltransférase (Lomans *et al.*, 2002).
- Par méthylation du sulfure dans des conditions anaérobies lors de la dégradation de composés aromatiques méthoxylés par certaines bactéries (Lomans *et al.*, 2002).
- Par dégradation bactérienne du DMSP (β -dimethylsulfoniopropionate), composé soufré tertiaire produit en grandes quantités par certains haptophytes (Keller *et al.*, 1989; Yoch, 2002) et halophytes (Ishida, 1996) pour la régulation de leur environnement osmotique interne. La dégradation peut impliquer soit une déméthylation initiale du DMSP formant ainsi le 3-methyl-thiopropionate (MTPA), qui peut être converti ensuite en méthane-thiol et en acrylate, soit un clivage enzymatique du DMSP en diméthylsulfure (DMS) qui est ensuite métabolisé en méthane-thiol (Kiene *et al.*, 1988).

Cette dernière source semble la plus courante en milieu naturel. De nombreuses bactéries capables de produire du méthane-thiol à partir de DMSP ont été isolées des environnements marins aérobies. La plupart appartiennent au groupe des α -protéobactéries (Yoch, 2002), principalement au genre *Roseobacter* (Gonzalez & Moran, 1997; Yoch, 2002). La production bactérienne de méthane-thiol à partir du DMPS a aussi été démontrée dans des sédiments marins anoxiques (Kiene & Taylor, 1988). Par conséquent, du fait (i)

de l'intervention de ce phénomène en conditions oxiques et sulfato-réductrices et (ii) des hautes concentrations cytosoliques de DMSP libérées durant la sénescence d'*E. huxleyi*, il est fortement probable que la stéréomutation des alcénones dans l'environnement marin résulte de l'action de radicaux thiyles provenant: soit de la dégradation bactérienne du DMSP (en conditions sulfato-réductrices et aérobie), soit de l'oxydation d'ions thiolates par des ions métalliques (en conditions sulfato-réductrices) (Fig. I-32).

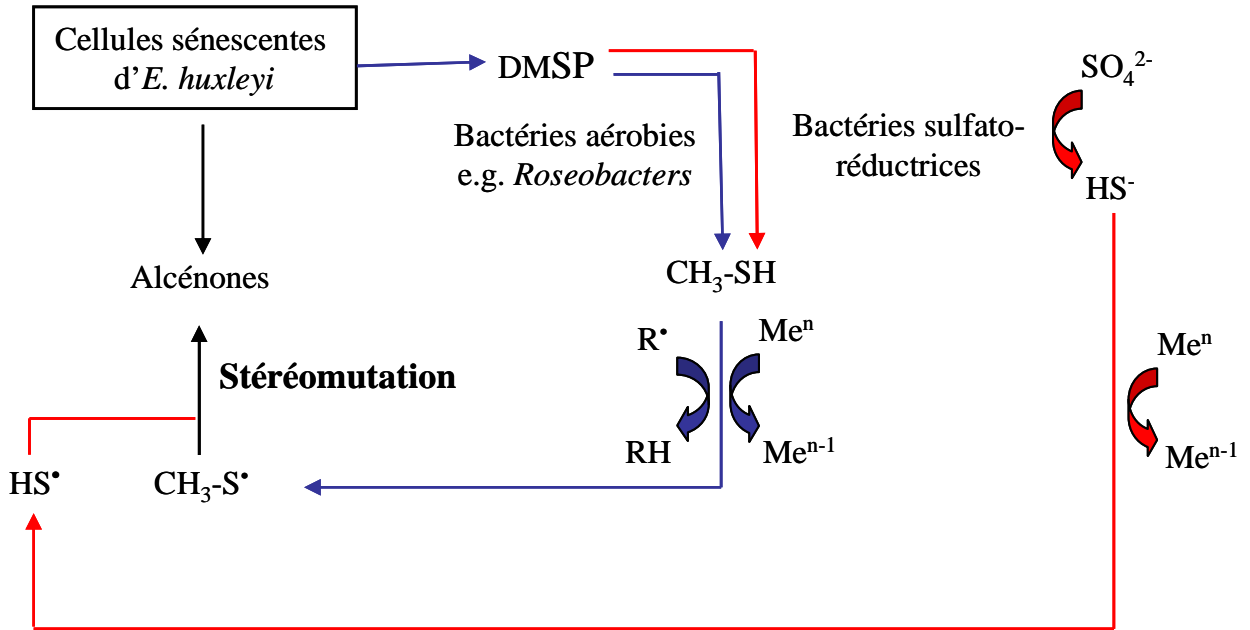


Fig. I-32. Mécanismes proposés pour la formation de radicaux thiyles inducteurs de stéréomutation dans (a) des conditions oxiques (en bleu) et (b) sulfato-réductrices (en rouge). (Meⁿ = ions métalliques, e.g. Fe³⁺, adaptée de Rontani et al., 2006b).

5.4.4. Mise en évidence des processus de stéréomutation en milieu naturel

Afin de mettre en évidence ces processus de stéréomutation en milieu naturel, Rontani *et al.* (2006a), ont examiné des sédiments (unit II) datant de l'Holocène collectés dans la mer Noire. Cet environnement anoxique, caractérisé par une intense activité sulfato-réductrice dans la colonne d'eau, était prédisposé à la mise en place de processus de stéréomutation. Des isomères des alcénones C_{35:2}, C_{36:2} et C_{38:2} (alcénones dominantes dans ces sédiments (Xu *et al.*, 2001; Prahl *et al.*, 2006b), ont pu être détectés du fait de leurs temps de rétention plus courts sur le chromatogramme. La proportion d'isomères *cis/trans* (≈20%) et *trans/trans* (≈80%) s'est révélée similaire à celle obtenue à l'équilibre lors des expériences *in vitro* (Cf. Ch. I-5.4.2).

Les processus de stéréomutation ont donc le potentiel d'affecter les mesures de l' $U_{37}^{K'}$ dans certaines conditions. Ces processus peuvent être induits dans des environnements anoxiques en conditions sulfato-réductrices mais également dans la colonne d'eau oxygénée (Rontani *et al.*, 2005a, 2006a; Rontani & Wakeham, 2008). Ces processus de stéréomutation résultent probablement en milieu aérobie de l'association très étroite qui existe entre les espèces bactériennes affiliées au genre *Roseobacter*, productrices de méthaneéthiol (Yoch, 2002) et *E. Huxleyi* (Zubkov *et al.*, 2001).

Bien que la mise en évidence de ce processus de stéréomutation reste pour l'instant limitée à la zone géographique particulière de la mer Noire, il constitue une source potentielle de biais lors des reconstructions de paléotempératures basées sur les alcénones.

6. La dégradation des alcénones en milieu naturel : étude de cas (Rontani & Wakeham, 2008)

Afin de mettre en évidence l'intervention de ces processus dégradatifs (biotiques et abiotiques) en milieu naturel, Rontani et Wakeham (2008) ont entrepris une nouvelle série d'analyse d'échantillons sédimentaires et de matériel particulaire en suspension provenant de la mer Noire; Ceci dans le but de déterminer si la diminution de la proportion de l'alcénone en $C_{37:3}$ avec la profondeur, préalablement observée par Freeman et Wakeham en 1992, pouvait résulter d'un ou de plusieurs de ces processus dégradatifs sélectifs (stéréomutation, autoxydation, dégradation bactérienne aérobie). Comme précédemment observé, la concentration en méthyl alcénone en $C_{37:2}$ s'est avérée diminuer lentement avec la profondeur alors que les concentrations en méthyl alcénones en $C_{37:3}$ et $C_{37:4}$ diminuaient grandement, aboutissant à une forte augmentation dans les valeurs de l' U_{37}^K et l' $U_{37}^{K'}$ (0,12 à 30 m ; 0,40 à 70 m et 0,51 à 800 m pour l' $U_{37}^{K'}$). Les auteurs ont attribué cette variabilité à trois facteurs différents : (i) à la présence de plusieurs haptophytes productrices d'alcénones fournissant des réponses distinctes aux changements de température, (ii) au fait que les particules collectées en profondeur (qui coulent lentement) correspondraient à des périodes plus chaudes de l'année que celles enregistrées par les particules à 30 m et (iii) à l'intervention de processus de dégradation sélectifs, résultant en la perte préférentielle des alcénones les plus insaturées. La première hypothèse se justifie particulièrement dans la mer Noire: en effet, du fait de la

détection d'alcénones peu communes comme les alcénones C_{37:4} et C_{38:4} ou C_{36:2}, l'existence d'au moins deux sources distinctes d'alcénones a été suspectée par plusieurs auteurs (Freeman & Wakeham, 1992). En revanche, les variations saisonnières paraissent insuffisantes pour expliquer à elles seules la forte augmentation de l' $U_{37}^{K'}$ avec la profondeur. Enfin, nous allons voir dans les paragraphes suivants, que cette augmentation de l'indice $U_{37}^{K'}$ peut aussi résulter de la perte préférentielle de l'alcénone en C_{37:3} due à l'intervention de processus de dégradation sélectifs.

6.1. La stéréomutation en milieu naturel

La détection préalable d'alcénones stéréomutées dans des sédiments datant de l'Holocène de la mer Noire (Rontani *et al.*, 2006a) suggérait que la stéréomutation induite par les radicaux thiyles pouvait être un phénomène important pour expliquer la variabilité observée dans les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ en mer Noire. Afin de tester cette hypothèse, les auteurs ont recherché la présence d'alcénones stéréomutées dans les échantillons de matériel particulaire et de sédiments. L'analyse au CPG-SMEI en mode SIM a conduit à la détection d'alcénones stéréomutées (ayant une configuration de la double liaison *cis*) caractérisées par un temps de rétention plus court que les alcénones "classiques" de configuration *trans* (Fig. I-33).

La proportion en alcénones MeC_{37:2} stéréomutées par rapport à la quantité totale d'alcénones en MeC_{37:2} variait de 0 à 18% en fonction des échantillons. Grâce à la réalisation d'une courbe corrective réalisée à partir d'incubations *in vitro* (Fig. I-34), les auteurs ont pu estimer que l'augmentation de l' $U_{37}^{K'}$ résultant des processus de stéréomutation dans la colonne d'eau de la mer Noire était de l'ordre de +0.06 (équivalente à +1.8°C).

6.2. La dégradation bactérienne en milieu naturel

Comme nous l'avons vu auparavant (Cf. Ch. I-5.3), la dégradation bactérienne aérobie présente également le potentiel d'augmenter les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et pourrait donc expliquer en partie les anomalies observées en mer Noire. L'analyse après réduction au NaBH₄ et silylation de certains échantillons a permis la détection d'une quantité significative de diols dérivant de la réduction d'époxyalcénones (Fig. I-35). Ces résultats ont permis de valider l'utilisation de ces composés comme traceurs des processus de biodégradation aérobie sélectifs des alcénones.

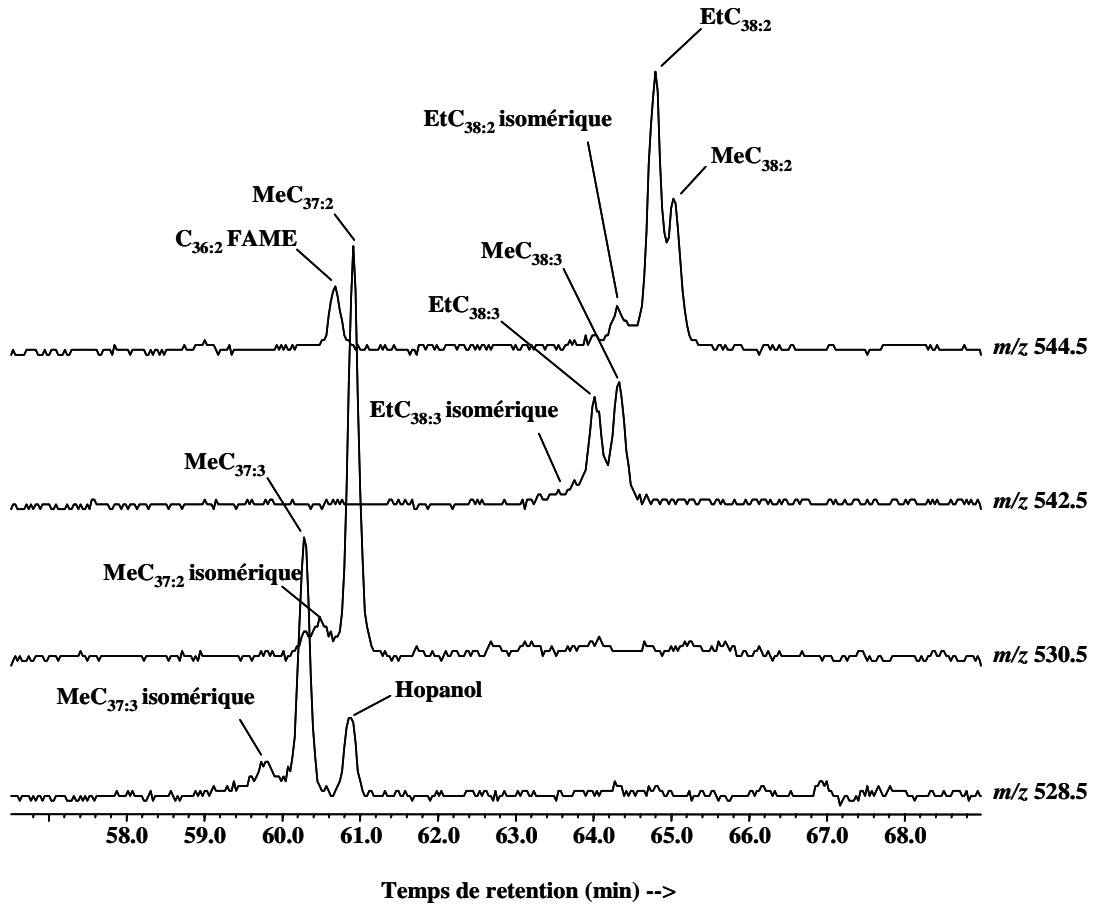


Fig. I-33. Analyse en CPG-SMEI en mode SIM de l'extrait lipidique de matériel particulaire prélevé à 100 m en mer Noire montrant la présence d'alcénones stéréomutées (Rontani et Wakeham, 2008).

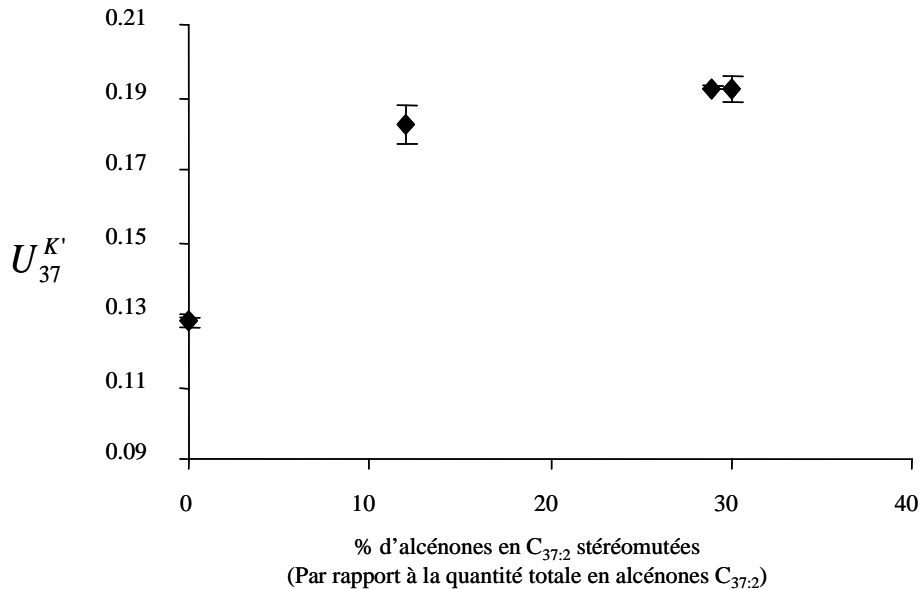


Fig. I-34. Variation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ en fonction du pourcentage d'alcénones en $MeC_{37:2}$ stéréomutées, observée par Rontani et al. (2006a) durant des incubations de *C. lamellosa* dans un mélange méthanol-éthanethiol. Déterminé après réduction au $NaBH_4$ et silylation (Rontani & Wakeham, 2008).

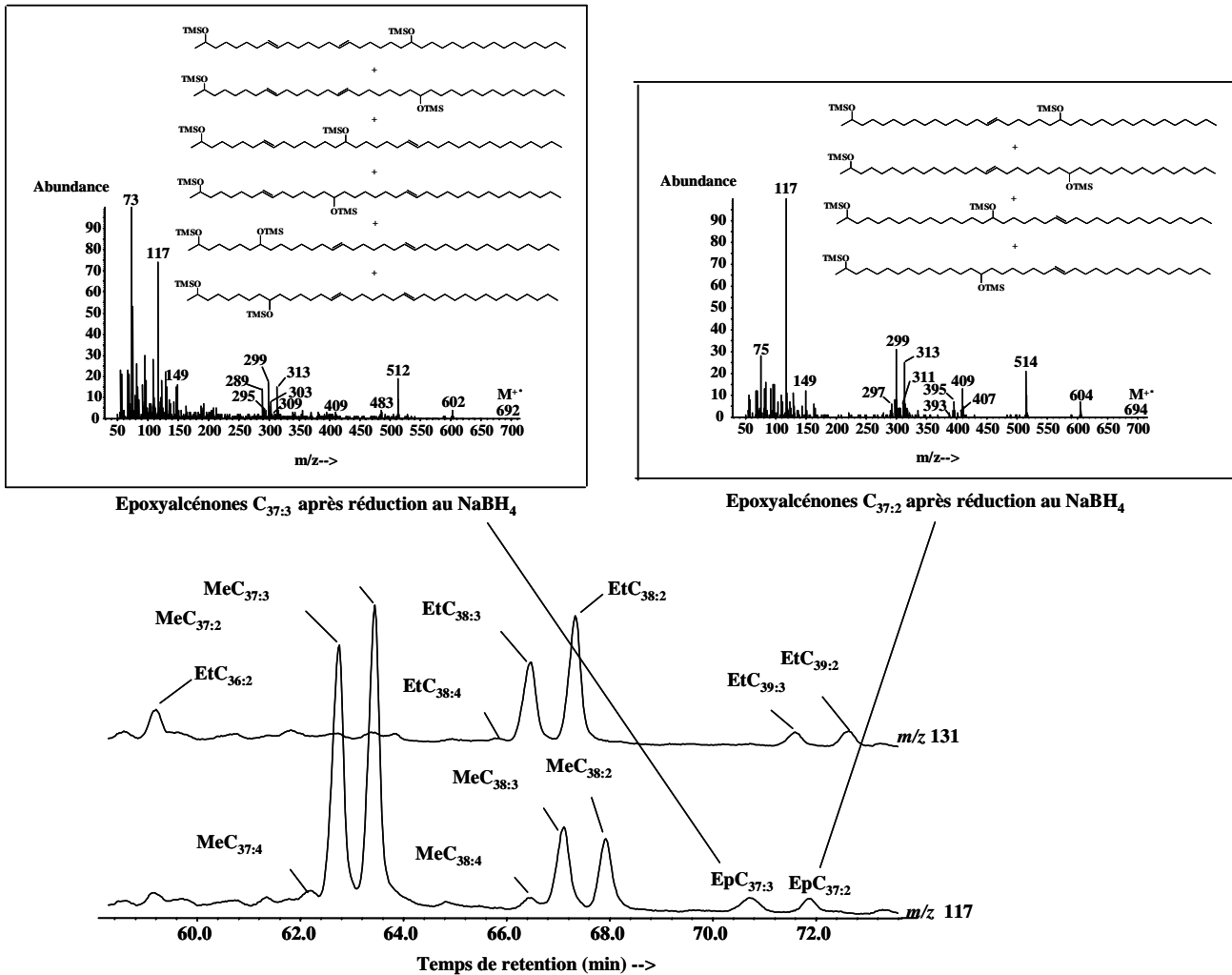


Fig. I-35. Analyse en CPG-SMEI en mode SIM de l'extrait lipidique d'un échantillon de matériel particulaire collecté à 800 m en mer Noire, après réduction au NaBH_4 et silylation, montrant la présence d'époxyalcénonesset leurs spectres de masse (Rontani & Wakeham, 2008).

Le rapport entre les concentrations des diols isomères (résultant de la réduction des époxyalcénoness) dérivant des alcénoness en $\text{C}_{37:3}$ et $\text{C}_{37:2}$ dans le matériel particulaire collecté à 800 m était de 3,3, alors que le ratio des concentrations en alcénoness résiduelles $[\text{C}_{37:3}]/[\text{C}_{37:2}]$ était de 1 ($U_{37}^{K'} = 0,5$). Sur la base de ces résultats, Rontani et Wakeham (2008) ont estimé que dans la couche oxique de la mer Noire (jusqu'à 100 m), les alcénoness en $\text{C}_{37:3}$ avaient été dégradées 3,3 fois plus rapidement que les alcénoness en $\text{C}_{37:2}$ par les bactéries aérobies. Une fois produites par les bactéries dans la couche oxique, les époxyalcénoness ne semblent pas subir de dégradation sélective durant leur sédimentation (ratio équivalent à 800 m et à 2000 m dans le sédiment). L'apparente préservation des époxyalcénoness a permis d'envisager l'utilisation de leurs abondances pour estimer le biais résultant des processus de dégradation bactérienne aérobie sélective. Les auteurs ont estimé que l'augmentation de l' $U_{37}^{K'}$ résultant

d'une dégradation bactérienne sélective était de l'ordre de +0,15. Ces résultats suggèrent la présence de bactéries aérobies capables de dégrader les alcénones avec une forte sélectivité en mer Noire. En effet, durant les incubations bactériennes effectuées précédemment par Rontani *et al.* (2008), la dégradation bactérienne paraissait limitée à une augmentation de l' $U_{37}^{K'}$ de +0,11.

6.3. La dégradation abiotique des alcénones en milieu naturel

Le manque de traceurs stables (Cf. Ch. I-5.2.2.3) permettant d'identifier la part de photoxydation et d'autoxydation agissant sur les alcénones rend impossible la mise en évidence "directe" de la part jouée par ces processus dans l'augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$. Une méthode "indirecte" a été proposée afin de tâcher d'estimer l'importance des phénomènes dégradatifs abiotiques sur les alcénones. Cette méthode utilise comme traceurs des produits de dégradation des Δ^5 -stérols (Fig. I-36).

En effet, du fait de leur relative stabilité et de la spécificité de certains de leurs produits de dégradation, les Δ^5 -stérols sont généralement considérés comme d'excellents biomarqueurs des transformations diagénétiques de la matière organique (Mackenzie *et al.*, 1982; Volkman, 1986; Wakeham & Beier, 1991). De plus, en partant du principe que les alcénones sont plus facilement autoxydées que les stérols (Rontani *et al.*, 2006b), l'observation d'un fort (ou faible) taux d'autoxydation des stérols suggère donc un fort (ou faible) taux d'oxydation des alcénones. Rontani et Wakeham (2008) ont utilisé les produits de la dégradation biotique des stérols incluant les Δ^4 -sten-3-ones, les stanones et les stanols (de Leeuw & Baas, 1986; Wakeham, 1989) et les produits de dégradation abiotique (3,5-,3,6- et 3,7-dihydroxystérols) générés après la réduction au NaBH_4 des hydroperoxystérols correspondants (Kulig & Smith, 1973; Smith *et al.*, 1973; Smith, 1981) afin de quantifier la part des produits de dégradation biotique et abiotique des stérols dans la couche oxique de la mer Noire. Les résultats obtenus à 70 m ont montré que la dégradation des stérols (et par conséquent celle des alcénones) à cette profondeur, est essentiellement dominée par des processus biotiques (70% de produits de dégradation biotique par rapport au stérol parent pour 5% de produits de dégradation abiotique).

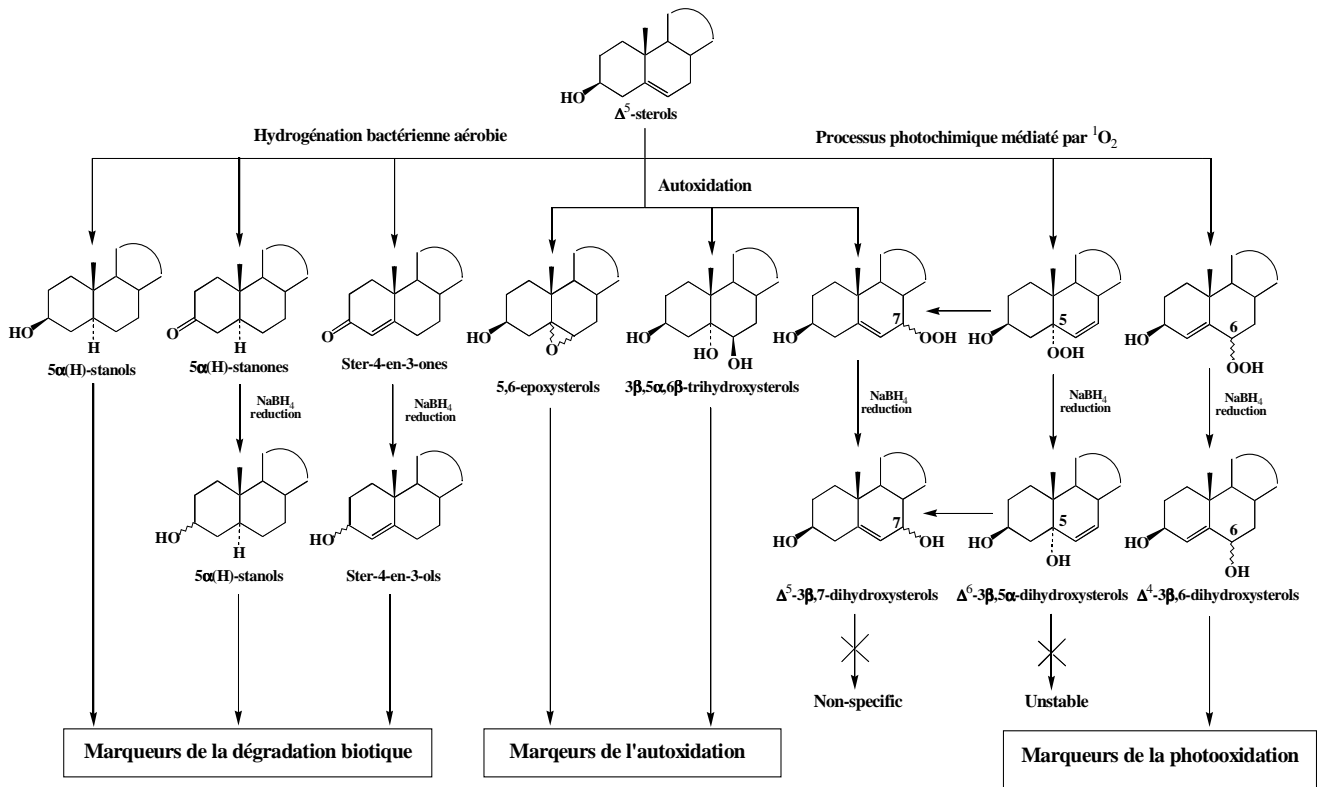


Fig. I-36. Les différents traceurs de la dégradation biotique et abiotique du Δ^5 -stérols, proposés par Rontani et al. (2009).

CHAPITRE II

**Altération potentielle du paléothermomètre $U_{37}^{K'}$
due à une dégradation sélective des alcénones par
des bactéries marines isolées à partir de
l'haptophyte *Emiliana huxleyi***

AVANT-PROPOS

L'effet des processus de dégradation sur les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ a longtemps été négligé. En effet, les premiers tests effectués *in vitro* (incubation de cellules d'*E. huxleyi* avec divers sédiments) n'ont pas mis en évidence d'altération de l'indice $U_{37}^{K'}$ par les processus de biodégradation aérobie et anaérobie et ce malgré une forte dégradation des alcénones. Sur la base de ces résultats, la forte dégradation des alcénones observée durant leur diagenèse a donc été considérée par la communauté scientifique comme étant non sélective. Cependant, des travaux plus récents (incubations de cellules d'*E. huxleyi* avec des communautés bactériennes provenant de tapis microbiens ou associées à cet haptophyte) ont remis en cause ces premières observations, puisque la possibilité d'une dégradation bactérienne sélective des alcénones en conditions aérobies a alors été mise en évidence. En effet au cours de ces différentes incubations, une sélectivité variable (variations de l' $U_{37}^{K'}$ allant de 0 à +0,1 correspondant à des variations de température de 0 à +3°C) a été observée en fonction des communautés bactériennes en présence (Cf. Ch. I-5.3.1). La détection d'époxyalcénones dans les cultures montrant une altération de l'indice $U_{37}^{K'}$ a suggéré l'existence d'au moins deux voies métaboliques de dégradation: (i) une impliquant l'oxydation des doubles liaisons des alcénones entraînant une dégradation sélective des alcénones di- et tri-insaturées et (ii) une autre faisant intervenir une attaque classique des extrémités de la chaîne conduisant à une dégradation non-sélective de ces composés.

La première partie de cette thèse a consisté à confirmer et à étendre ces résultats préliminaires en identifiant les bactéries impliquées dans la biodégradation (sélective ou non sélective) des alcénones et les voies métaboliques mises en jeu. Afin de réaliser ce travail, 29 souches bactériennes aérobies ont été isolées à partir de cultures non axéniques d'*E. huxleyi* TWP1 montrant une variabilité importante des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ ($0,63 \pm 0,15$). 7 espèces distinctes ont été sélectionnées suite à une analyse par PCR-DGGE de l'ensemble des 29 souches isolées et identifiées. Toutes les souches bactériennes (à l'exception de *Stappia* sp. AG2) se sont montrées capables de dégrader efficacement les alcénones suggérant que de nombreuses bactéries marines ont la capacité de dégrader ces paléomarqueurs. Bien que cette dégradation des alcénones en C_{37} se soit révélée non sélective par la plupart des isolats (*Oceanicaulis alexandrii*, *Sphingomonas* sp. AG6, *Nocardioides* sp. S3, *Marinobacter* sp. S2 et

Micrococcus sp. AG10), *Dietzia maris*, souche bactérienne largement distribuée dans l'environnement marin, s'est avérée capable de dégrader l'alcénone en $C_{37:3}$ 1,8 fois plus rapidement que l'alcénone en $C_{37:2}$. Ainsi, les incohérences observées lors des différentes études portant sur la dégradation bactérienne aérobie des alcénones pourraient simplement s'expliquer par la diversité métabolique des communautés bactériennes en présence lors des différentes incubations.

Cette dégradation sélective fait intervenir une époxydation initiale des doubles liaisons des alcénones, qui est vraisemblablement induite par une monooxygénase et conduit à la production d'époxyalcénones. Outre la sélectivité de l'attaque résultant de la présence d'une double liaison supplémentaire chez l'alcénone en $C_{37:3}$ (réactivité 1,5 fois plus importante par rapport à l'alcénone en $C_{37:2}$), la monooxygénase présente une affinité plus importante vis-à-vis de la double liaison en position $\omega 29$ (présente uniquement chez l'alcénone en $C_{37:3}$).

Dans cette étude, cette dégradation sélective a conduit à une augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ de +0,05 à + 0,10 (équivalente à une élévation de température de 1,5 à 3°C). Ces résultats confirment que les processus de dégradation bactérienne sélectifs peuvent introduire des biais significatifs dans la reconstruction des paléotempératures.

Potential alteration of $U_{37}^{K'}$ paleothermometer due to selective degradation of alkenones by marine bacteria isolated from the haptophyte *Emiliana huxleyi*

Zabeti, N., Bonin, P., Volkman, J. K., Jameson, I. D., Guasco, S, Rontani, J.-F.

Accepté pour publication dans FEMS Microbiology Ecology (2010)

ABSTRACT

The unsaturation ratio of C₃₇ alkenones ($U_{37}^{K'}$) produced by haptophyte microalgae such as *Emiliana huxleyi* is often used as proxy for past sea surface temperature. In this study, 29 bacterial strains were isolated from cultures of the strain *E. huxleyi* TWP1. Among alkenone-degrading isolates, the strain *Dietzia maris* sp. S1 appeared to be able to selectively degrade alkenones leading to increases in the palaeoenvironmental proxy $U_{37}^{K'}$ by +0.05 to +0.10 units, which is equivalent to the change seen when the growth temperature is increased by 1.5 to 3.0°C. This degradation was shown to involve initial epoxidation of the alkenone double bonds presumably by a monooxygenase, which showed a preference for oxidation of the ω29 double bond. Inconsistencies observed in previous studies of the aerobic microbial degradation of alkenones may simply reflect which species of bacteria were present. Our results confirm that intense aerobic bacterial degradative processes can introduce a bias in palaeotemperature reconstructions especially when there is evidence of substantial aerobic bacterial degradation of the deposited organic matter. The widespread occurrence of epoxyalkenones in the marine environment strongly suggests that selective aerobic bacterial degradation could be major source of uncertainty for paleotemperature estimation.

Keywords: *Emiliana huxleyi*; Alkenones; Aerobic bacteria; Degradation pathways; Selectivity; Epoxidation of double bonds; Alteration of $U_{37}^{K'}$ index.

1. Introduction

Alkenones represent a class of unusual, C₃₅-C₄₀ straight-chain, mono, di-, tri- and tetraunsaturated methyl and ethyl ketones that are synthesized by a limited number of haptophyte microalgae. In the open ocean *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica* are the two dominant sources of alkenones (Volkman *et al.*, 1980a; 1995; Marlowe *et al.*, 1990; Conte *et al.*, 1995)[†]. Alkenone distributions were proposed in the mid-1980s as a palaeoceanographic proxy for the reconstruction of sea surface temperatures (SSTs; Brassell *et al.*, 1986; Prahil & Wakeham, 1987), and since then have been widely applied to assess changes in SSTs in the late Quaternary.

Early studies using laboratory cultures of *E. huxleyi* demonstrated that the proportion of di- to triunsaturated C₃₇ alkenones increased with increasing water temperature (Brassell *et al.*, 1986; Prahil & Wakeham, 1987). Thanks to this feature and the ubiquity of alkenones in recent and ancient marine sediment, the alkenone unsaturation index, $U_{37}^{K'} = [C_{37:2}] / ([C_{37:2}] + [C_{37:3}])$, where [C_{37:2}] and [C_{37:3}] are the concentrations of di- and tri-unsaturated C₃₇ alkenones respectively, was proposed as a palaeotemperature proxy. $U_{37}^{K'}$ analyses are now a routine method for SST reconstruction in palaeoceanographic studies (Ruehlemann, 1999; Lawrence *et al.*, 2006; McGregor *et al.*, 2007). However, the relationship between alkenone unsaturation and temperature is sometimes not so clear cut and several discrepancies between alkenone-derived sea surface temperatures (SSTs), and those derived from other proxies such oxygen isotopes or foraminiferal assemblages (Volkman, 2000) or with mean SSTs (Conte *et al.*, 1992; 2001; Gong & Hollander, 1999; Rosell-Mele *et al.*, 2000; Harada *et al.*, 2001) have been observed.

The use of the $U_{37}^{K'}$ index has gained wide acceptance, but many ecological and environmental factors are now known to affect alkenone distributions (Volkman, 2000). Many studies have now documented significant degradation of alkenones in the water column and surface sediments (Prahil *et al.*, 1989a; Sikes *et al.*, 1991; Conte *et al.*, 1992; Freeman & Wakeham, 1992; Madureira *et al.*, 1995; Hoefs *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004). Selective bacterial degradation could be a major process for altering $U_{37}^{K'}$ values. Indeed, if the more unsaturated components are selectively degraded, these processes will

[†] Les références bibliographiques ont été centralisées à la fin du manuscrit

increase the $U_{37}^{K'}$ value and potentially compromise its use as the reliable absolute measure of sea surface temperature. However, few studies have been carried out to confirm the selectivity of bacterial degradation of alkenones and the results obtained to date have been inconsistent. Teece *et al.* (1998) incubated *E. huxleyi* cells with sediments under oxic and anoxic conditions. Although a significant degradation of C₃₇ methyl alkenones was observed under all the conditions examined (85% degraded under oxic conditions), $U_{37}^{K'}$ values remained constant. Rontani *et al.* (2005) isolated bacterial communities able to efficiently degrade alkenones under aerobic conditions from microbial mats having high contents of alkenones (Rontani *et al.*, 2005a). A variable selectivity was observed during the microbial attack on C₃₇ alkenones resulting in variations of the $U_{37}^{K'}$ index ranging from 0 to +0.10 that corresponds to an inferred temperature difference of 0 to +3 °C. More recently, four aerobic bacterial communities were also isolated from *E. huxleyi* strain TWP1 cultures, some of them appeared to degrade alkenones selectively and others non-selectively (Rontani *et al.*, 2008). In the case of selective degradation, increases in $U_{37}^{K'}$ values corresponded to a +2 °C and +3.3 °C change in the inferred temperatures. The detection of epoxyalkenones in the cultures exhibiting $U_{37}^{K'}$ alteration strongly suggested the involvement of two distinct metabolic pathways during alkenone degradation by aerobic bacteria: one involving attack on the terminal groups of the molecule (non-selective degradation) and another acting on alkenone double bonds (selective degradation).

In this study we have isolated from *E. huxleyi* cultures a suite of bacterial strains able to degrade alkenones, suggesting that many marine bacteria may have the ability to degrade these biomarkers. Selective degradation of C₃₇ alkenones has been highlighted for the first time for one of the isolates, *Dietzia maris* sp. S1. The identification of epoxides allowed us to propose likely metabolic pathways for the selective degradation of alkenones.

2. Material and methods

3.1. Freeze-dried cells of *E. huxleyi* strain CS-57

This strain was chosen as substrate for bacterial incubation as its alkenone unsaturation ratio was found to be quite stable at a given temperature. In contrast, probably due to its very high bacterial content, the strain *E. huxleyi* TWP1 exhibited strongly variable $U_{37}^{K'}$ values hindering a precise monitoring of the selectivity of alkenone biodegradation.

CS-57 *Emiliana huxleyi* (Lohmann) Hay et Mohler, isolated by R. Guillard in 1960 from an unknown location in the Sargasso Sea is maintained by the Australian National Algae Culture Collection (ANACC – formerly CSIRO Culture Collection of Living Microalgae) in 50 ml glass Erlenmeyer flasks in f/2 medium (Jeffrey & LeRoi, 1997) at 20 °C and 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. 1200 ml of a late logarithmic phase culture was used to inoculate 3100 ml of f/2 culture in a 10 l glass carboy. The carboy culture was grown at 20 °C in a constant environment controlled cabinet with a light intensity of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on a 16:8 hour light: dark cycle, and was gently aerated (air only) with a 47 mm 0.2 μm air filter. Culture aliquots were harvested after 4 weeks using Beckman 500 ml centrifuge tubes spun on a Sorvall RC26 Plus centrifuge (SLA-3000 rotor) at 6000 g for 15 min. The supernatant was aspirated off and 500 ml concentrates were then combined and transferred to Corning 50 ml tubes and centrifuged on an Eppendorf 5810 R benchtop unit at 6000 g for 5 min. The final 3 x 15 ml concentrates were vortexed for 15 s, transferred to Labconco 80 ml glass flasks, and frozen at -20 °C. The three tubes were then freeze dried overnight in a Labconco Freezone 6 and the products combined to give a yield of 1.54 g for further analyses.

3.2. Purified C_{37} alkenones

The total lipid extract obtained after extraction and alkaline hydrolysis of freeze-dried *E. huxleyi* strain CS-57 cells (500 mg) was chromatographed over a wet-packed (*n*-hexane) column of silica gel (Kieselgel 60, 27 x 1.3 cm). After an initial elution with hexane (100 ml) to remove hydrocarbons, three fractions were eluted with toluene (3 x 50 ml). The first fraction was discarded and the second and the third yielded, after solvent removal by rotary evaporation, ethyl (11 mg) and methyl (14 mg) alkenones, respectively.

3.3. Bacterial isolation and growth media

E. huxleyi strain TWP1 obtained from the Caen (France) Algalbank was used for bacterial isolation. A 100 ml starter culture of *E. huxleyi* was transferred to flasks containing 1500 ml of f/2 medium and grown at 20 °C, using 116 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ cool white fluorescent light (Osram, fluora) under a 12 h light:12 h dark regime for 10 days. After 7 days, the algal cultures were serially diluted and appropriate dilutions were spread onto agar plates containing 5 g yeast extract (Merieux), 5 g Biotrypcase (Merieux) and 15 g of agar (Merieux) per litre of synthetic sea water (SSW; Baumann & Baumann, 1981). Microbial colonies were picked out and re-plated to check for purity on the basis of their colony morphology and microscopy observations. 29 bacterial strains were isolated. All isolates were stored in liquid nitrogen in the presence of glycerol (20%).

The Eh growth medium consisted of autoclaved Synthetic Sea Water (SSW; Baumann & Baumann, 1981) supplemented with iron sulfate (0.1 mM) and potassium phosphate (0.33 mM). Aerobic cultures were incubated at 20 °C in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml Eh medium and sterilized freeze-dried cells of *E. huxleyi* strain CS-57 (12 mg per flask) or purified methyl alkenones (1 mg per flask) were used as substrate for alkenone degradation. The flasks were agitated on a reciprocal shaker (96 rev.min⁻¹, 5 cm amplitude). For each experiment, 4 flasks were inoculated, one for monitoring growth and biodiversity and the others for the determination of $U_{37}^{K'}$ values and identification of any metabolites produced during the different incubation times. In order to monitor the degradation of alkenones by the different bacteria, sterile controls were prepared in the same way as the bacterial incubation flasks but without adding the bacterial inoculum prior to incubation.

3.4. DNA extraction, PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) analysis

Cell lysis and DNA extraction were performed as described by (Zhou *et al.*, 1996). A conserved region of approximately 568 bp from 16S rRNA gene was amplified using GM5F with a GC clamp and 907R primer set as previously described (Bonin *et al.*, 2002). PCR conditions, including hot start and touch down, were similar to those used by Muyzer *et al.* (1993).

DGGE was performed using a D-code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc). Samples containing approximately equal amounts of PCR products (300 ng) were loaded onto 1-mm-thick, 6% (wt/vol) polyacrylamide gels with a denaturation gradient from 30 to 50% for 16S rRNA genes (100% of denaturation corresponds to 7 M urea and 40% formamide). Electrophoresis was run at 60 °C for 5.5 h at 150 V in 1x TAE (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA). Following electrophoresis, the gels were incubated for 30 min in 1x TAE buffer containing ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and photographed on a UV transilluminator (GelDoc 2000, gel documentation system, Bio-Rad).

3.5. Sequencing and comparative analysis of 16S rRNA partial sequences of the isolates

PCRs were carried out in a 25 μl reaction mixture (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2) containing 0.25 mM of each desoxyribonucleoside triphosphate, 2 μM of each primer, 0.5 units of *Taq* polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 2 μl of diluted DNA. The 16S rRNA gene fragment was amplified using a set of primers (Eu3 forward: AAGGAGGTGATCCAGCC and Eu5b reverse: AGAGTTTGATNMTGGCTCAGA (Rontani *et al.*, 1997c). Due to difficulties in amplifying 16S rDNA using these primers, other reverse primers were also used: Rd1 (AAGGAGGTGATCCAGCC) for *Oceanicaulis alexandrii* or 1392r (ACGGGCGGTGTGTGTRC) for *Dietzia maris*.

PCR products of partial 16S rRNA genes from the isolates were sequenced by GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). The partial sequences were aligned with the same region of the closest-relative strains available in the GenBank database using BLAST (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequence alignment was achieved using ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987). A bootstrap analysis with 500 replicates was carried out to check the robustness of the tree. Finally, the tree was plotted using the Mega 4 program (Tamura *et al.*, 2007). Sequences obtained are available from EMBL under the accession numbers: FN562398, FN562399, FN562400, FN562401, FN562402, FN562403, FN562404 and FN562405 for *D. maris* sp. S1, *Stappia* sp. AG2, *Marinobacter* sp. S2, *Nocardioides* sp. S3, *O. alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7, *Micrococcus* sp. AG10 and *Sphingomonas* sp. AG6, respectively.

3.6. Lipid extraction

Samples were extracted with chloroform-methanol-water (1:2:0.8, v/v/v) using ultrasonication. Lipid recovery was tested by adding an internal standard (C₃₆ *n*-alkane). To initiate phase separation after ultrasonication, chloroform and purified water were added to the combined extracts to give a final volume ratio for chloroform-methanol-water of 1:1:0.9 (v/v/v). The upper aqueous phase was subsequently extracted twice with chloroform and evaporated to dryness under vacuum.

3.7. Alkaline hydrolysis

Water (25 ml), methanol (25 ml) and potassium hydroxide (2.8 g) were added to the organic residue obtained after ultrasonication (containing total solvent-extractable lipids) and the mixture was directly saponified by refluxing for 2 h. After cooling, the content of the flask was then acidified with hydrochloric acid (pH 1) and subsequently extracted three times with dichloromethane. The combined dichloromethane extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under vacuum.

3.8. Alkenone reduction

Total lipid extracts were reduced (1 hr) in diethyl ether:methanol (4:1, v/v) (5 ml) by excess NaBH₄ (10 mg/mg of extract). After reduction, a saturated solution of ammonium chloride (10 ml) was added cautiously to destroy excess reagent, the pH was adjusted to 1 with diluted hydrochloric acid (2 N) and the mixture was shaken and extracted three times with hexane:chloroform (4:1, v/v). The combined extracts were dried as described above and evaporated to dryness under a stream of nitrogen.

3.9. Hydrogenation

Some extracts were hydrogenated (under an atmosphere of H₂) in CH₃OH with Pd/CaCO₃ (5% Pd, 10-20 mg/mg of extract, Aldrich) as a catalyst for 12 h with magnetic stirring. After hydrogenation, the catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated using rotary evaporation.

3.10. Derivatization

After solvent evaporation, residues were taken up in 300 μ l of a mixture of pyridine and pure N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Supelco) (2:1, v/v) and silylated for 1 h at 50 °C. After evaporation to dryness under a stream of nitrogen gas, the derivatized residues were taken up in a mixture of ethyl acetate and BSTFA for analysis by GC-MS.

3.11. Gas chromatography-electron impact mass spectrometry (GC-EIMS) analyses

GC-EIMS analyses were carried out with an Agilent 6890 gas chromatograph connected to an Agilent 5973 Inert mass spectrometer. The following operating conditions were employed: 30 m x 0.25 mm (i.d.) fused silica capillary column coated with SOLGEL-1 (SGE; 0.25 μ m film thickness); oven temperature programmed from 70 °C to 130 °C at 20 °C min⁻¹, from 130 °C to 250 °C at 5 °C min⁻¹ and then from 250 °C to 300 °C at 3 °C min⁻¹; carrier gas (He) maintained at 0.69 bar until the end of the temperature program and then programmed from 0.69 bar to 1.49 bar at 0.04 bar min⁻¹; injector (on column with retention gap) temperature, 50 °C; electron energy, 70 eV; source temperature, 190 °C; cycle time, 1.99 cycles s⁻¹.

3. Results and discussion

1. Bacterial isolation and DGGE analysis

$U_{37}^{K'}$ values in various *E. huxleyi* TWP1 cultures grown at 20 °C showed significant variations (0.63 \pm 0.15). Concomitantly, 16S rRNA gene PCR-DGGE performed on these *E. huxleyi* cultures showed the presence of a bacterial community, as illustrated in figure II-1. The upper band was identified by sequencing and further analysis as a fragment of DNA of the *E. huxleyi* chloroplast. The pattern corresponding to the bacterial community was simple and only one major band with a smear can be clearly observed showing that the community is dominated by a major component (Fig. II-1, lanes 1 & 2). These results could support the existence of bacterial strains in this community able to selectively degrade alkenones and were in accordance with the observations made during a previous study (Rontani *et al.*, 2008).

However, the variations of $U_{37}^{K'}$ values might also have been due to other factors such as (i) changes in nutrient availability during *E. huxleyi* growth (Prahl *et al.*, 2003); (ii) an effect of the growth status of the algae (Conte *et al.*, 1995, Epstein *et al.*, 1998) or (iii) an attack of alkenone double bonds by peroxy radicals (autoxidation; Rontani *et al.*, 2006b).

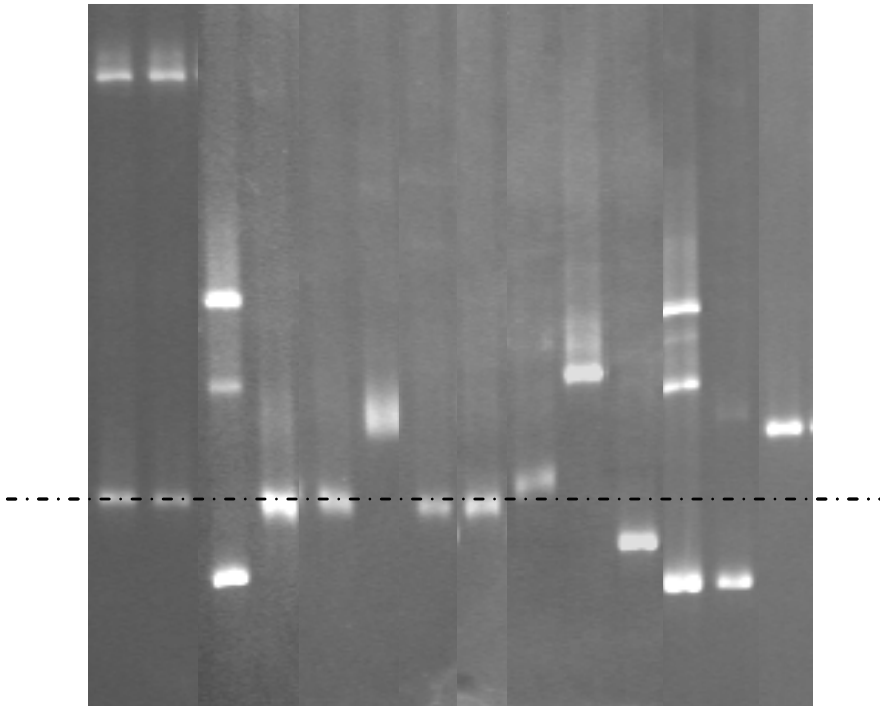


Fig. II-1. DGGE separation patterns of PCR-amplified sequences of 16S rRNA genes derived from *Emiliana huxleyi* cultures (lanes 1 and 2) and from strains isolated from the same cultures: *Oceanicaulis alexandrii* sp. AG5, #5 (lane 4); *O. alexandrii* sp. AG9, #5 (lane 5); *Sphingomonas* sp. AG6, #6 (lane 6); *O. alexandrii* sp. AG7, #5 (lane 7); *O. alexandrii* sp. AG4, #5 (lane 8); *Dietzia maris* sp. S1, #1 (lane 9); *Marinobacter* sp. S2, #3 (lane 10); *Nocardioides* sp. S3, #4 (lane 11), *Micrococcus* sp. AG10, #7 (lane 13); *Stappia* sp. AG2, #2 (lane 14). Lanes 3 and 12: migration standard from top to bottom (*Clostridium perfringens*, 560 bp, G1C = 52.8%; *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, 580bp, G1C= 51%; and *Micrococcus luteus*, 571bp, G1C = 57.6%).

To test the hypothesis of selective biodegradation of alkenones, 29 bacterial isolates associated with these *E. huxleyi* cultures were obtained from cultures of *E. huxleyi* strain TWP1. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR amplified fragments of 16S rRNA genes of the isolates was used to quickly assess their taxonomy. DGGE bands were referenced according to their electrophoretic mobility. When the *E. huxleyi* culture DGGE

pattern was compared with the electrophoretic mobility of the DNA fragment of the isolates, the major band in the community matched with the pattern of phylotype #5 (see Fig. II-1). To avoid ambiguities, all isolates showing pattern #5 were deposited on the same electrophoresis gel and showed identical electrophoretic motilities as well as the same sequence (Fig. II-1, lanes 4, 5, 7 and 8). So, we assumed that bands having the same mobility also have the same sequence and they were thus assigned to the same strain. Seven different mobility patterns were observed among our set of isolates (#1 to #7; Fig. II-1, lanes 4-11 and 13-14). The distribution of the strains among the different patterns was not equal (Table II-1). For patterns such as #7, 8 strains were isolated, whereas patterns #3, #4, and #6 were represented by 4 strains each, pattern #5 by 5 strains, pattern #2 by 2 strains and pattern #1 by only one strain (Table II-1).

Comparison of 16S rRNA gene sequence of the AG4, AG5, AG7, AG8 and AG9 strains with those of reference organisms showed that these isolates were phylogenetically related to *Oceanicaulis alexandrii* C112 previously isolated from the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech CCMP 116 (NEPCC C116) during a survey of the diversity of bacteria associated with paralytic shellfish toxin-producing cultures of *Alexandrium* spp. (Dinophyta).

Concerning the other strains, the 16S rRNA gene sequence of the strain AG2 located this bacterium in the neighbourhood of the genus *Stappia*, with 100% similarity with the 16S rRNA gene sequence of the strain *Stappia alba* isolated from oysters recovered from the Spanish Mediterranean coast (Pujalte, *et al.*, 2005) (Table II-1, Cf. annexe I). Strain AG6 was identified as a *Sphingomonas* strain, but the closest neighbour was *Sphingomonas paucimobilis* with only 95.2% similarity. The 16S rRNA gene sequence similarity values of strains S1, S2, S3 and AG10 matched with the sequences of cultured strains *Dietzia maris*, *Nocardioides* sp., *Marinobacter* sp. and *Micrococcus luteus*, with 100, 97.1, 97.5 and 100% similarity, respectively (Table II-1, Cf. annexe I).

Table II-1. Degradation of alkenones observed after incubation of sterile cells of *Emiliania huxleyi* strain CS-57 with the different isolates

Strains	Phylotypes	Number of isolates/29	Homology (%)	Neighbor joining	U_{37}^k	Degradation	Degradation
						MeC _{37:3} (%) [*]	MeC _{37:2} (%) [*]
Dietzia maris sp. S1	#1	1	100	Dietzia maris (FJ468333)	0.65	40	17
Marinobacter sp. S2	#3	4	97.5	M. hydrocarbonoclasticus (X67022)	0.62	70	64
Nocardioides sp. S3	#4	4	100	Nocardioides sp. JC2056 (AY423719)	0.61	36	26
Stappia sp. AG2	#2	2	100	Stappia marina (AY628423.1)	0.57	0	0
Oceanicaulis alexandrii sp. AG4	#5	5	100	Oceanicaulis alexandrii C116 (AJ309862)	0.58	29	28
Sphingomonas sp. AG6	#6	4	95.1	Sphingomonas paucimobilis (X94100.1)	0.58	20	20
Micrococcus sp. AG10	#7	8	100	Micrococcus luteus G3-6-08 (FJ816022)	0.57	33	35

* Values calculated relative to the sterile controls

2. Degradation of alkenones by the different strains isolated

All the selected strains were tested for their ability to degrade the C₃₇ alkenones, and if positive whether this degradation was selective or not. For this purpose, bacterial strains were incubated with freeze-dried *E. huxleyi* strain CS-57 cells as the only carbon source. In order to monitor the degradation of alkenones by the bacterial strains, sterile incubation controls were carried out in parallel without adding any bacterial inocula. Any variability in the $U_{37}^{K'}$ values compared to these sterile controls ($U_{37}^{K'} = 0.575 \pm 0.005$) was attributed to selective degradation by bacteria because there was no change in alkenone distributions in freeze-dried *E. huxleyi* cells.

After incubation for 21 days, the alkenone contents of the different samples were analyzed after NaBH₄-reduction and subsequent silylation. The silylated alkenols thus formed display better chromatographic characteristics than the corresponding alkenones and have diagnostic EI mass spectra exhibiting strong fragments ions at m/z 117 and 131 (cleavage α to the functional group), allowing methyl and ethyl alkenols (and hence the parent alkenones) to be readily differentiated by selected ion monitoring (SIM), even at low abundances (Rontani, *et al.*, 2001).

On the basis of the results reported in Table II-1, three categories of strains could be distinguished: (i) those strains which do not degrade the C₃₇ alkenones; (ii) those degrading the C₃₇ alkenones non-selectively; and (iii) those able to selectively degrade the C₃₇ alkenones. These results confirm and extend the previous observations by Rontani *et al.* (2008). It is interesting to note that most of the strains isolated under these conditions, with

the exception of *Stappia* sp. AG2, were able to degrade alkenones. Degradation of alkenones by the strains *Dietzia maris* sp. S1, *Marinobacter* sp. S2 and *Nocardioides* sp. S3 resulted in an apparent increase in $U_{37}^{K'}$ values (ranging from +0.03 to +0.07).

In order to confirm these observations, these three strains were incubated with freeze-dried *E. huxleyi* cells for different times and in triplicate. The results obtained (Table II-2, Fig. II-2) confirmed the ability of the strain *D. maris* sp. S1 to selectively degrade alkenones. The increase of $U_{37}^{K'}$ index observed (ranging from +0.05 to +0.10) is equivalent to an inferred increase in growth temperature of 1.5-3.0 °C. In contrast, the selectivity of the alkenone degradation by the strains *Marinobacter* sp. S2 and *Nocardioides* sp. S3 observed during the first test appeared to be not significant (pair wise, t student test, $p=0.117$ and $0.553 > 0.05$, $n=3$ for *Marinobacter* sp. S2 and *Nocardioides* sp. S3 respectively) (Table II-2). Alkenone degradation by these strains, although very efficient, was not selective.

Table II-2. Degradation of alkenones observed after incubation of sterile cells of *Emiliana huxleyi* strain CS-57 with the strains *Dietzia maris* sp. S1, *Marinobacter* sp. S2 and *Nocardioides* sp. S3

Experiment		Incubation time (Days)			
		0	7	14	21
Sterile control	$U_{37}^{K'}$	0.584±0.010 ^a			
<i>Dietzia maris</i> sp. S1	$U_{37}^{K'}$	0.584±0.010	0.654*±0.002	0.662*±0.014	0.653*±0.010
	% degradation $C_{37.3}$	0	43.0±0.1	55.1±21.1	62.3±9.9
	% degradation $C_{37.2}$	0	23.2±0.7	38.8±26.2	49.1±14.9
<i>Marinobacter</i> sp. S2	$U_{37}^{K'}$	0.584±0.010	0.596±0.010	0.606±0.023	0.598±0.001
	% degradation $C_{37.3}$	0	56.4±3.7	59.7±11.7	43.7±9.0
	% degradation $C_{37.2}$	0	50.9±5.1	43.3±17.7	39.5±9.9
<i>Nocardioides</i> sp. S3	$U_{37}^{K'}$	0.584±0.010	0.589±0.018	0.576±0.017	0.581±0.021
	% degradation $C_{37.3}$	0	69.5±2.6	61.4±4.6	64.2±15.9
	% degradation $C_{37.2}$	0	68.5±3.7	61.1±2.9	64.3±15.7

^a Mean of triplicates

* Statistical differences in $U_{37}^{K'}$ value between time series and initial incubation time (pair wise, t student test, $p < 0.05$, $n=3$)

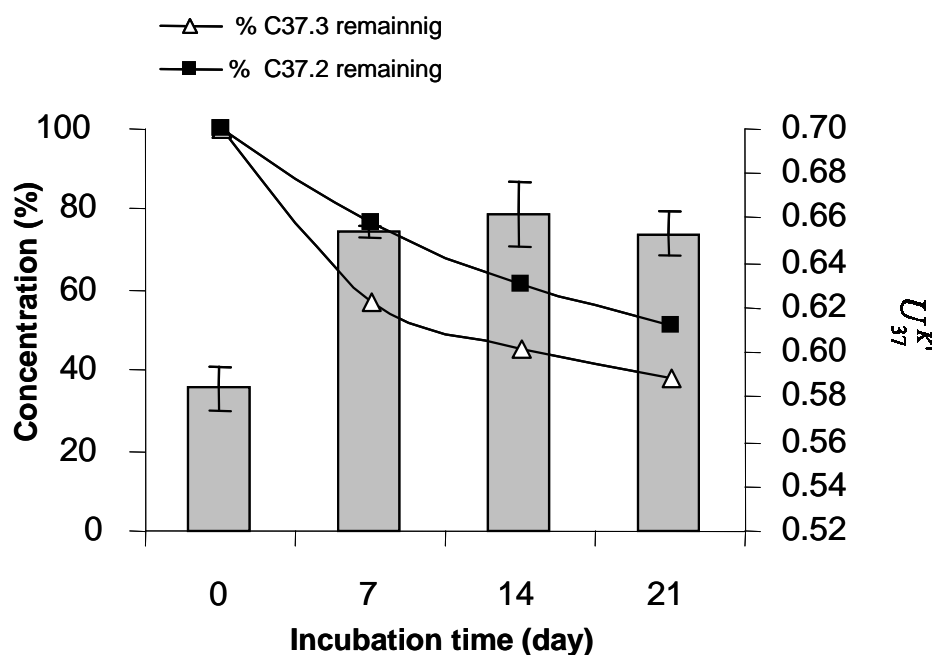


Fig. II-2. Degradation of alkenones observed after incubation of sterile cells of the *Emiliana huxleyi* strain CS-57 with the strain *Dietzia maris* sp.S1.

Aerobic bacterial metabolism of unsaturated aliphatic ketones such as alkenones may be initiated either by the same mechanisms employed in alkanone metabolism or *via* attack at the double bonds. It was previously suggested that bacteria able to degrade alkenones selectively used metabolic pathways involving initial attack (epoxidation) of the double bonds (Rontani *et al.*, 2008). In order to confirm this hypothesis and determine what metabolic pathways are employed by the strain *D. maris* sp. S1 to degrade alkenones, this strain was incubated with purified C₃₇-C₃₉ methyl alkenones. After incubation, GC-EIMS analyses of the NaBH₄-reduced lipid extracts allowed us to detect significant amounts of isomeric diols (lacking in sterile controls) (Fig. II-3) resulting from the NaBH₄ reduction of the corresponding ketoepoxides produced after bacterial oxidation of alkenone double bonds (Rontani *et al.*, 2008). The degradation of alkenones by the strain *D. maris* sp. S1 thus involves initial epoxidation of their double bonds. The proportion of diunsaturated epoxyalkenones relative to the parent C_{37:3} alkenone was 1.8 ± 0.1 times higher than that of the monounsaturated epoxyalkenones relative to the parent C_{37:2} alkenone attesting to the selectivity of the bacterial attack. This selectivity is not simply due to the presence of three double bonds in the C_{37:3} alkenone and of two in the C_{37:2} alkenone, since in this case the reactivity of the triunsaturated alkenone would be only 1.5 times higher than that of the diunsaturated alkenone.

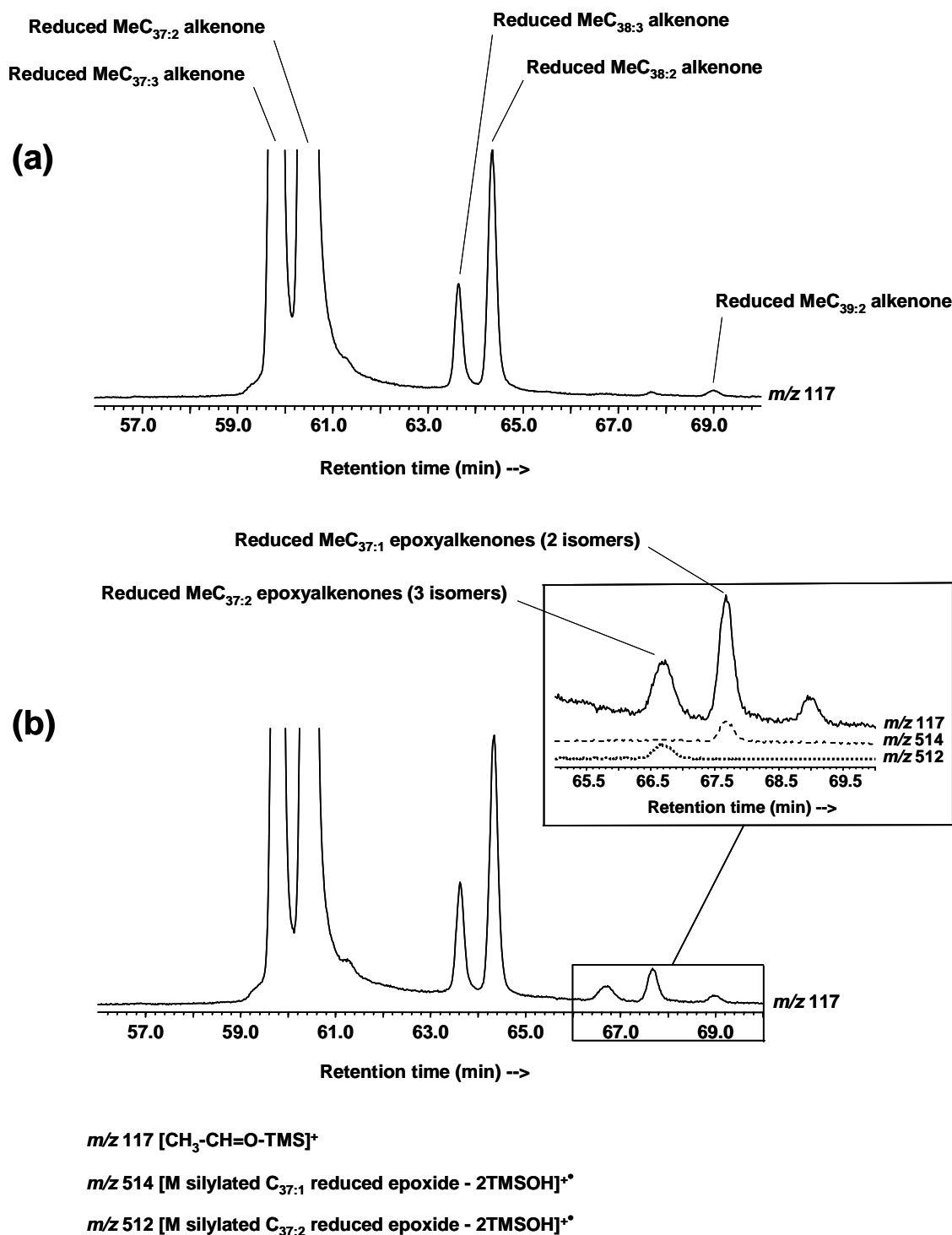


Fig. II-3. Partial m/z 117, 512 and 514 mass fragmentograms of silylated NaBH_4 -reduced total lipid extracts obtained after incubation of a purified C_{37} – C_{39} methyl alkenone fraction before (a) and after (b) incubation with *Dietzia maris* sp. S1 for 1 week. Note the occurrence of epoxyalkenones in the latter due to epoxidation of one of the double bonds in the parent alkenone (i.e. the methyl $\text{C}_{37:3}$ alkenone gives rise to three methyl $\text{C}_{37:2}$ epoxyalkenones and the methyl $\text{C}_{37:2}$ alkenone gives rise to two methyl $\text{C}_{37:1}$ epoxyalkenones), both analysed as the alcohols following NaBH_4 reduction.

The difference observed may be attributed to a higher affinity of the monooxygenase inducing epoxidation of the ω 29 double bond. Careful examination by GC-EIMS of the diols resulting from NaBH_4 -reduction, hydrogenation and silylation of epoxyalkenones allowed us to estimate the selectivity of enzymatic attack towards the ω 15, ω 22 and ω 29 double bonds to be 25, 32 and 43%, respectively. These estimates, which are comparable to those previously obtained in the case of bacterial communities isolated from *E. huxleyi* cells (Rontani *et al.*, 2008), are based on the abundances of fragment ions resulting from α -cleavage of the TMS ether groups of the fully hydrogenated diols measured at 15 eV (in order to avoid subsequent selective cleavage of these fragment ions) (Fig. II-4) and take into account the proportion of initial alkenones. Indeed, the epoxide resulting from the ω 29 double bond only results from the $\text{C}_{37:3}$ alkenone while those resulting from the ω 15 and ω 22 double bonds arise from di- and triunsaturated alkenones (Fig. II-4).

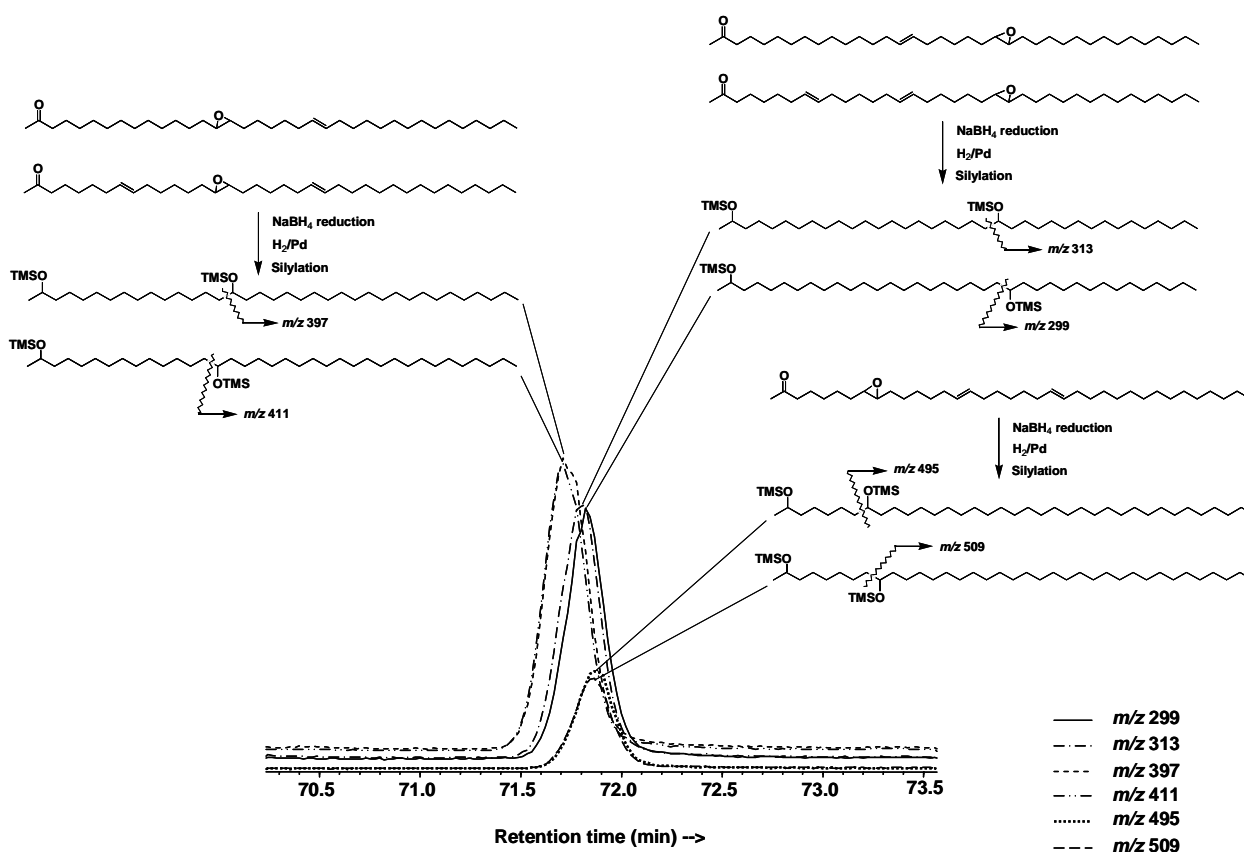
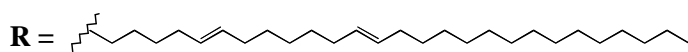
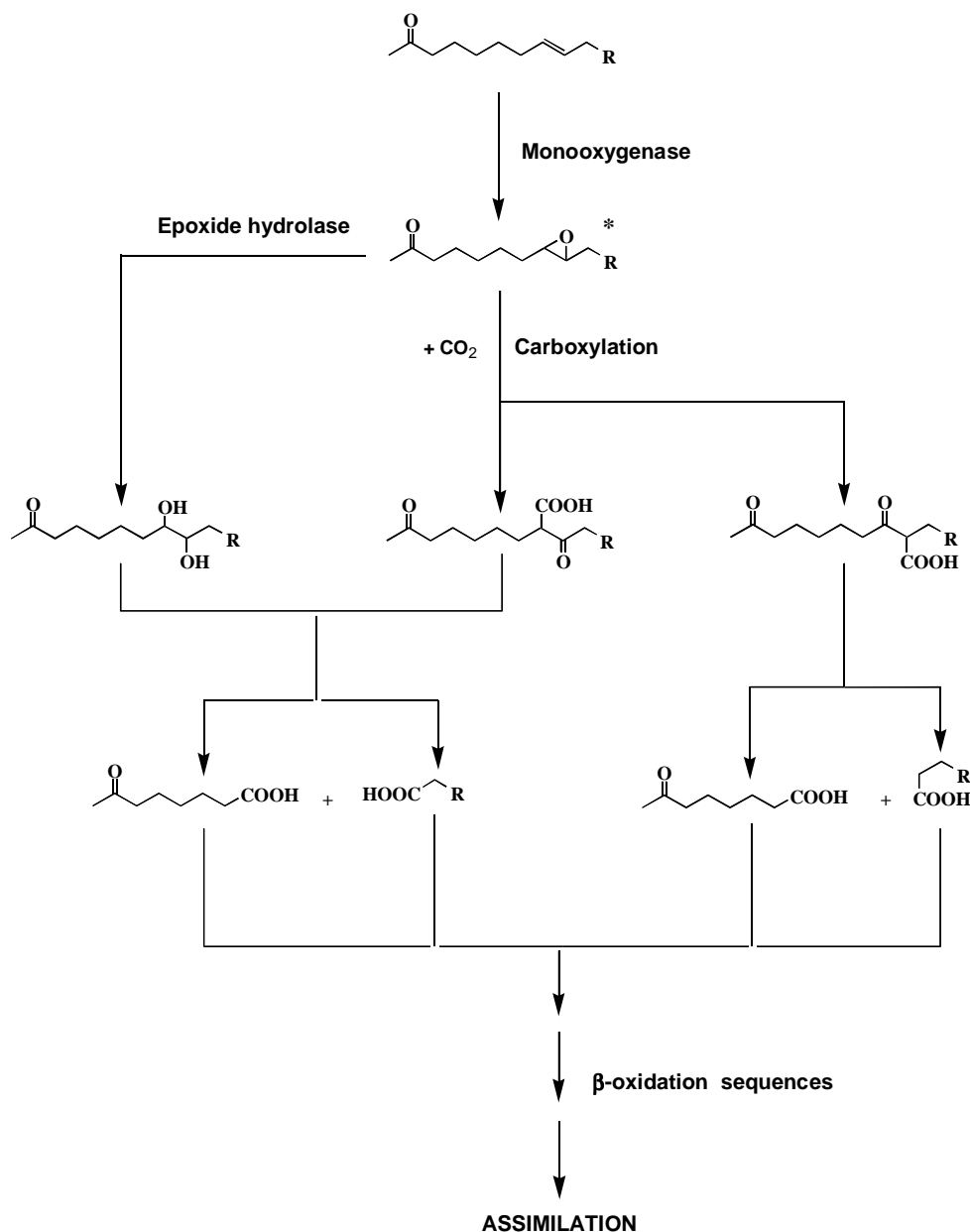


Fig. II-4. Partial m/z 299, 313, 397, 411, 495 and 509 mass fragmentograms (recorded at 15 eV) of silylated NaBH_4 -reduced and hydrogenated total lipid extracts obtained after incubation of a purified C_{37} – C_{39} methyl alkenone fraction with *Dietzia maris* sp. S1 for 1 week.

Epoxidation is mediated by cytochrome P-450-dependent monooxygenases. These enzymes can produce epoxides from a broad range of lipophilic substrates such as *n*-alkenes (Klug & Markovetz, 1968; Hartmans *et al.*, 1989a; Soltani *et al.*, 2004), terpenes (Duetz *et al.*, 2003), unsaturated fatty acids (for a review see Ratledge, 1994) and styrene (Hartmans *et al.*, 1989b). Enzymes from a large number of enzyme classes, including dehydrogenases, lyases, carboxylases, glutathione S-transferases, isomerases and hydrolases, are involved in the microbial degradation of epoxides (van der Werf *et al.*, 1998). Among these, epoxide hydrolases, which catalyze the addition of water to epoxides to form the corresponding diols, and carboxylases affording β -ketoacids from epoxides have been extensively studied and seem to be widely distributed in bacteria (e.g. Michaels *et al.*, 1980; Small & Ensign, 1995; Allen & Ensign, 1996; van der Werf *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2005). We thus propose the pathways described in figure II-5 for the degradation of alkenones by the strain *D. maris* sp. S1 via an initial double bond epoxidation. Processes depicted involve: (i) hydrolysis of the epoxide to the corresponding diol and subsequent oxidative cleavage, the resulting ketoacid and acid fragments being then totally assimilated by way of classical β -oxidation, or (ii) carboxylation of the epoxide to isomeric β -keto-acids, which are subsequently cleaved and assimilated by classical β -oxidation sequences. Note that epoxide hydrolase activity has been observed in *Dietzia* sp. (Mantovani *et al.*, 2006). The strains degrading alkenones non-selectively probably use metabolic pathways involving attack on the terminal groups of the molecule. This attack could involve: (i) terminal methyl oxidation (Ratledge, 1978); (ii) oxidation of the keto terminal methyl group and decarboxylation of the resulting α -ketoacid (Gillan, *et al.*, 1983); or enzymatic oxidation of the keto group to an ester, analogous to Baeyer-Villiger oxidation with peracids (Britton, *et al.*, 1974) followed by hydrolysis of the ester to a primary alcohol and acetic acid; the different compounds thus formed being then assimilated by way of β -oxidation. Due to the occurrence of 2,3-enoyl-CoA isomerase in bacteria (Ratledge, 1994), the presence or absence of an additional double bond in the chain of alkenones should not affect the degradation rates of di- and triunsaturated alkenones.

We failed to detect metabolites resulting from non-selective degradation of alkenones. It is interesting to note that $C_{35:2}$, $C_{35:3}$ and $C_{35:4}$ alken-1-ols arising from the degradation of di-, tri- and tetraunsaturated alkenones, respectively, *via* a bacterial-mediated Baeyer-Villiger sequence appeared to be sufficiently stable to be detected in alkenone-rich Camargue microbial mats (Rontani & Volkman, 2005). The lack of such compounds after non-selective degradation of alkenones by the different isolates thus suggests that these processes involved

either terminal methyl oxidation or oxidation of the keto terminal methyl group. In both cases, metabolic intermediates should be very short-lived.



* Metabolite identified

Fig. II-5. Proposed pathways for the biodegradation of the $C_{37:3}$ alkenone by the strain *Dietzia maris* sp. S1 involving initial epoxidation of the ω_{29} double bond.

3. Biogeochemical implications

These results may explain some of the inconsistencies in the results obtained during previous studies of the aerobic microbial degradation processes of alkenones. Indeed, according to which bacteria are present, the results could be totally different. Alkenone degradation might appear selective in some cases (Rontani *et al.*, 2005a; 2008) and non-selective in others (Teece *et al.*, 1998; Rontani *et al.*, 2005a; 2008).

The actinomycete genus *Dietzia* was proposed to accommodate organisms previously classified as *Rhodococcus maris* (Rainey *et al.*, 1995). *Dietzia maris* appeared to be widely distributed in the marine environment (e.g. Colquhoun *et al.*, 1998; 2000; Bykova *et al.*, 2000; Inagaki *et al.*, 2003; Stach *et al.*, 2003; Gontang *et al.*, 2007). The occurrence of bacteria able to degrade alkenones selectively in the marine environment is thus very likely. Although the capability to selectively degrade alkenones could be only unambiguously demonstrated for the strain *D. maris* sp. S1 in the present work, it seems likely that other marine aerobic bacteria might also attack alkenone double bonds and thus alter the $U_{37}^{K'}$ index. This assumption is strongly supported by the recent detection of significant amounts of epoxyalkenones in sediments from the Black Sea (Rontani & Wakeham, 2008), Alaska (Prah *et al.*, 2010) and the upwelling off Peru (Rontani, unpublished results) and in particulate matter samples from the Black Sea (Rontani & Wakeham, 2008), Pacific Ocean and Arabian Sea (Rontani, unpublished results), which is indicative of *in situ* aerobic bacterial alteration of the alkenone unsaturation ratio. These observations attest to the wide occurrence of bacteria able to attack alkenone double bonds in the marine environment.

The results of the present work confirm that intense aerobic microbial degradative processes have the potential to introduce a bias in the palaeotemperature reconstruction and thus this factor should be considered when examining sediments in which there is clear evidence of substantial aerobic microbial degradation of the deposited organic matter. In contrast, alkenones appeared to be degraded non-selectively under anaerobic (denitrifying, sulphate-reducing and methanogenic) conditions (Teece *et al.*, 1998; Rontani *et al.*, 2005a). Although the existence of anaerobes able to hydrate alkenone double bonds selectively cannot be totally excluded, we speculate that anaerobic degradation of alkenones mainly involves attack at the carbonyl group and consequently occurs non-selectively.

4. Conclusions

Many microalgae co-exist with closely associated bacterial consortia. Most of the isolated strains in this study are able to efficiently degrade alkenones suggesting that many marine bacteria may have the ability to degrade these biomarkers. Although the degradation of C₃₇ alkenones by *Sphingomonas* sp. AG6, *Nocardioides* sp. S3, *Marinobacter* sp. S2 and *Micrococcus* sp. AG10 appeared to be non-selective, the strain *Dietzia maris* sp. S1 was able to selectively degrade di- and triunsaturated alkenones. This degradation is thought to be carried out by a monooxygenase that epoxidizes the alkenone double bonds with a preference for attack on the ω₉ double bond. Inconsistencies observed in previous studies of the aerobic microbial degradation of alkenones (Teece *et al.*, 1998; Rontani *et al.*, 2005a; 2008) may simply reflect which species of bacteria were present in the enrichments. In our study, this selective degradation leads to increases in the palaeoenvironmental proxy $U_{37}^{K'}$ by +0.05 to +0.10 units, which are equivalent to changes in growth temperature of +1.5 to +3.0 °C, providing further evidence that intense aerobic microbial degradative processes have the potential to introduce a bias in palaeotemperature reconstructions using the $U_{37}^{K'}$ proxy.

Acknowledgements

The authors acknowledge support of this work by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de la Méditerranée. Two anonymous reviewers are gratefully acknowledged for their useful and constructive comments.

CHAPITRE III

**Composition en acides gras de souches
bactériennes associées à l'haptophyte *Emiliana
huxleyi***

AVANT-PROPOS

Les différentes souches bactériennes isolées précédemment à partir d'une culture de l'haptophyte *E. huxleyi* TWP1 (Cf. Ch. II) se sont révélées particulièrement intéressantes de par leurs profils en acides gras atypiques. Ce chapitre a consisté à déterminer précisément la composition en acides gras de ces 7 souches, à savoir: *Dietzia maris* sp. S1, *Stappia* sp. AG2, *Nocardioides* sp. S3, *Sphingomonas* sp. AG6, *Oceanicaulis alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7 et *Micrococcus* sp. AG10.

La composition en acides gras à chaîne linéaire (saturés et mono-insaturés) et ramifiés en positions *iso*- et *anteiso*- des différentes souches bactériennes étudiées est apparue extrêmement diversifiée, illustrant la grande variabilité des profils en acides gras des bactéries marines. Les modes de synthèse de ces différents composés ont été rappelés. Des expériences de marquage isotopique au deutérium ont été menées et ont permis de confirmer que l'acide 11-méthyl-octadéc-12-énoïque (présent chez de nombreuses bactéries) provenait de la méthylation par la méthionine de l'acide *cis*-vaccénique. Le rôle de cet acide gras ramifié comme précurseur de l'acide gras furanique 10,13-époxy-11-méthyl-octadéca-10,12-diénoïque a également pu être démontré.

Le contenu en acides gras totaux des différentes souches testées s'est révélé très variable (0,3% à 4% du poids sec). L'utilisation d'une valeur constante de 100 μmol d'acides gras/g de poids sec soit 2 à 3% du poids sec pour estimer la biomasse bactérienne dans les sédiments peut donc être à la source d'erreurs significatives.

Certains acides gras sont fréquemment utilisés en géochimie organique comme biomarqueurs des bactéries en présence. Les acides gras typiquement attribués aux bactéries sont essentiellement : (i) les acides gras à chaîne carbonée impaire, (ii) les acides gras ramifiés en positions *iso*- et *anteiso*- en $\text{C}_{15:0}$ et $\text{C}_{17:0}$, (iii) l'acide *cis*-vaccénique ($\text{C}_{18:1\Delta 11}$) et (iv) l'acide 11,12-méthylène-octadécanoïque. Cependant, nos résultats ont montré que les acides gras à chaînes paires sont également communs et abondants chez certaines bactéries. De plus, comme nous l'avons observé chez *D. maris* sp.S1 et *Nocardioides* sp.S3, l'acide *cis*-vaccénique ($\text{C}_{18:1\Delta 11}$) ne prédomine pas toujours par rapport à l'acide oléique ($\text{C}_{18:1\Delta 9}$). De même, l'absence d'acides gras ramifiés chez *D. maris* sp. S1, *O. alexandrii* sp. AG4, *Sphingomonas* sp. AG6 et *O. alexandrii* sp. AG7 montre que les acides gras *iso*- et *anteiso*-

ramifiés ne se retrouvent pas systématiquement dans toutes les bactéries. Ainsi, l'analyse de la composition en acides gras sur les souches bactériennes marines étudiées a permis de mettre en évidence certaines limites de ces biomarqueurs, et notamment qu'une estimation de la contribution bactérienne basée uniquement sur ces acides gras peut entraîner une sous-estimation de la contribution bactérienne.

Différents 3-hydroxyacides (de condensation en atomes de carbone allant de C₁₁ à C₁₈) ont été détectés chez les espèces *Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7 et *Micrococcus* sp. AG10. Ces composants des membranes cellulaires sont habituellement considérés comme caractéristiques des bactéries Gram-négatives. La présence de quantités importantes de ces 3-hydroxyacides (principalement en C_{15:0} ramifiés en positions *iso*- et *anteiso*-) chez la souche *Micrococcus* sp. AG10 a permis de confirmer que ces composés étaient également présents chez les bactéries Gram-positives.

L'acide 11-méthyl-octadéc-12-énoïque, qui a été préalablement observé chez de nombreuses bactéries, a été également détecté dans 4 de nos souches (*Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7 et *Sphingomonas* sp. AG6), confirmant son importance en tant qu'acide gras bactérien. Il est intéressant de noter que cet acide gras est présent notamment chez l'espèce bactérienne *Stappia* sp. AG2, alors que le principal acide gras ramifié mono-insaturé détecté précédemment chez les bactéries appartenant à ce genre était l'acide 11-méthyl-octadéc-11-énoïque. Cette différence a été attribuée à une erreur dans l'attribution de la position de la double liaison lors des études précédentes. En effet, lors des analyses en CPG-SMEI, la double liaison des acides gras mono-insaturés ramifiés migre facilement vers le groupement méthyle de la ramification et les ions résultant du clivage du groupement méthylidène ainsi formé peuvent conduire à une attribution erronée de la position de la double liaison (Cf. annexe II).

La composition en acide gras de *D. maris* sp. S1 (souche dégradant sélectivement les alcénones, Cf. Ch. II) s'est révélée particulièrement intéressante. En effet, cette bactérie contient des quantités très importantes d'acides gras linéaires en C₁₅ et C₁₇ et des acides gras peu communs chez les bactéries tel que l'acide 10-méthylheptadécanoïque. Mais cette espèce se caractérise également par sa signature très spécifique en acides mycoliques (cires présentes dans la paroi des bactéries Actinomycétales). En effet, des acides mycoliques de condensation en atomes de carbone allant de C₃₀ à C₃₈ ont été préalablement observés chez le genre *Dietzia* (*D. maris* 58001). Ces acides présentaient une proportion quasiment identique de chaînes à

nombres d'atomes de carbone pairs et impairs et une forte dominance de chaînes saturées (98%). Curieusement, notre souche *D. maris* sp.S1 possède une composition en acides mycoliques de condensation en atomes de carbone allant de C₃₂ à C₃₇ avec une prédominance de chaînes impaires (>78% de C₂₁) et une forte proportion de chaînes mono- et di- insaturées (>52%). La composition caractéristique en acides gras de *D. maris* sp. S1, notamment son profil en acides mycoliques pourrait constituer un indicateur de la présence de cette souche dans l'environnement marin. Ainsi la détection de ces acides gras, confortée par la présence d'époxyalcénones (résultant d'une dégradation biotique des alcénones, Cf. Ch. II), pourrait indiquer une éventuelle dégradation biotique sélective des alcénones et donc l'existence de biais lors des estimations de paléotempératures.

Fatty acid composition of bacterial strains associated with living cells of the haptophyte *Emiliana huxleyi*

Zabeti, N, Bonin, P, Volkman, J.K., Guasco, S, Rontani, J.-F.

Organic geochemistry (2010a), **41**: 627-636

ABSTRACT

A number of bacterial strains previously isolated from living cells of the marine haptophyte *Emiliana huxleyi* and identified from their 16S r-DNA profiles as *Dietzia maris* sp. S1, *Stappia* sp. AG2, *Nocardioides* sp. S3, *Sphingomonas* sp. AG6, *Oceanicaulis alexandrii* sp. AG4, *Oceanicaulis alexandrii* sp. AG7 and *Micrococcus* sp. AG10 were cultured for examination of their fatty acid compositions. The total fatty acid (TFA) contents of the different bacterial strains ranged from 0.3% to 4% dry weight, which suggests that the use of a single value when converting fatty acid contents to estimates of bacterial biomass may have a significant error. A variety of fatty acid distributions was observed illustrating the diverse patterns found in bacteria from marine ecosystems. Some species showed a dominance of saturated and monounsaturated straight-chain fatty acids while in others *iso*- and *anteiso*-branched fatty acids were the major constituents. The specificity and possible modes of biosynthesis of the unusual constituents 11-methyloctadec-12-enoic and 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-enoic acids found in some species are discussed. Deuterium labeling allowed us to demonstrate that these two compounds arise from the methionine-mediated methylation of *cis*-vaccenic acid which well supports the previously proposed role of this monounsaturated fatty acid as the precursor of bacterial furan fatty acids. The strain *Sphingomonas* sp. AG6 contains C₁₄-C₁₆ 2-hydroxyacids (strongly dominated by 2-hydroxytetradecanoic acid), which are components of sphingolipidic structures linked to sphingosine by amide bonds. 3-Hydroxyacids ranging from C₁₁ to C₁₈ were detected in *Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7 and *Micrococcus* sp. AG10. These compounds are classical components of cell wall lipopolysaccharides. C₃₂-C₃₇ mycolic acids exhibiting an unusually high degree of unsaturation and dominance of odd-numbered carbon main-chains (> 78% of the fatty acids contained a C₂₁ main-chain) were detected in

the strain *D. maris* sp. S1. These data provide further examples of the close associations of different types of bacteria with geochemically important algal species.

Keywords: *Emiliana huxleyi*; associated bacteria; fatty acids; biomarkers, biosynthesis; deuterium labelling; furan fatty acids; mycolic acids, hydroxy fatty acids.

1. Introduction

There are several examples of close associations between bacteria and algae (e.g. Caldwell, 1977; Cole, 1982; Allgaier *et al.*, 2008; Sapp *et al.*, 2008; Amin *et al.*, 2009)[‡]. Anyone who has tried to grow axenic algal cultures will appreciate the tenacity of some of these associations and consequent difficulties in obtaining axenic cultures of some microalgae. Several processes are involved in the transfer of organic material from algae to bacteria: (i) bacteria may parasitize an algal cell, (ii) they may obtain nutrition during the decomposition of a dead cell, or (iii) organic material such as exo-polysaccharides released from the alga during cell growth may also be available to bacteria (Cole, 1982). Some results (Berland *et al.*, 1972) suggest that the microbes associated with phytoplankton show high degrees of specialization compared with more generalist microflora in ambient seawater.

Recently, we isolated different bacterial communities from cells of the cosmopolitan haptophyte *E. huxleyi* strain TWP1 (Rontani *et al.*, 2008). Some of these “specialized” communities appeared to be capable of selectively degrading alkenones, which are unusual very long-chain lipids found in *E. huxleyi* (Volkman *et al.*, 1980b) and few other haptophytes (Marlowe *et al.*, 1984; Volkman *et al.*, 1995; Rontani *et al.*, 2004). These compounds are used as palaeoceanographic proxies for reconstruction of sea surface temperatures (SSTs; e.g. Brassell *et al.*, 1986; Prah & Wakeham 1987; Eglinton *et al.*, 1992), and this selective degradation has the potential to introduce a significant ‘warm’ bias in the palaeotemperature reconstructions (Rontani *et al.*, 2008).

More recently we isolated individual bacterial strains from cells of *E. huxleyi* strain TWP1 in order to determine the identity of bacteria able to degrade alkenones selectively or non-selectively (Zabeti *et al.*, 2010b). Many of the bacteria that we isolated exhibited unusual fatty acid profiles, which are described in the present work.

[‡] Les références bibliographiques ont été centralisées à la fin du manuscrit

2. Material and methods

2.1. Bacterial growth medium

The basic growth medium consisted of 50 ml of autoclaved artificial sea water (Baumann & Baumann, 1981) supplemented with yeast extract and peptone (5 g l⁻¹ for each). Cultures were maintained at 20 °C on a reciprocal shaker (96 rev min⁻¹, 5 cm amplitude).

2.2. Treatment of bacterial cultures

At the beginning of the stationary phase (7 days), the total content of the culture flasks was transferred to a liquid-liquid continuous extractor. The interior of the flasks was rinsed with chloroform and the washings poured into the extractor allowing the solvent to fall slowly through the sample, which was then extracted with 50 ml of chloroform for 5 h. The different extracts thus obtained were dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated by means of rotary evaporation.

2.3. Alkaline hydrolysis

Alkaline hydrolysis of the residue obtained after continuous extraction was performed in order to obtain total (free and esterified) fatty acid fractions. For this purpose, water (25 ml), methanol (25 ml) and potassium hydroxide (2.8 g) were added and the mixture was directly saponified by refluxing for 2 h. After cooling, the content of the flask was then acidified with hydrochloric acid (pH 1) and extracted (3x) with dichloromethane. The combined dichloromethane extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness under vacuum. Total fatty acid fractions thus obtained were analyzed by using gas chromatography-electron ionization mass spectrometry (GC-EIMS) after derivatization to the corresponding trimethylsilyl or methyl esters.

2.4. Silylation

After solvent evaporation, total fatty acid fractions were taken up in 400 µl of a mixture of pyridine and pure N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA; Supelco) (3:1, v/v)

and silylated for 1 h at 50°C. After evaporation to dryness under a stream of N₂, the derivatized residues were taken up in a mixture of ethyl acetate and BSTFA for analysis using GC-EIMS.

2.5. Methylation

Total fatty acid fractions were taken up in 2 ml of anhydrous methanolic hydrochloric acid (3N, Supelco) and heated at 80 °C for 1 hour (Mansour *et al.*, 1999). After cooling, an excess of water was added and methyl esters were extracted (3x) with hexane/chloroform (4:1, v/v), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated using rotary evaporation.

2.6. Acidic hydrolysis

In order to hydrolyze amide bonds of sphingolipids, the residues obtained after alkaline hydrolysis of *Sphingomonas* sp AG6 were treated with 2 M HCl by refluxing for 4 h (Rontani *et al.*, 2005b). After cooling, the reaction mixture was extracted (3x) with CH₂Cl₂. The combined extracts were then dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated using rotary evaporation at 40 °C.

2.7. Hydrogenation

Some total fatty acid fractions were hydrogenated to confirm the structure of the carbon chain (Rontani *et al.*, 2005b). This was carried out under an atmosphere of H₂ in methanol with Pd/CaCO₃ (5% Pd, 10-20 mg/mg of extract; Aldrich) as catalyst for 12 h with magnetic stirring. After hydrogenation, the catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated by rotary evaporation.

2.8. Formation of pyrrolidide derivatives to determine double bond positions

Pyrrolidide derivatives were obtained from the corresponding methyl esters (Andersson & Holman, 1973). Methyl esters were dissolved in 1 ml pyrrolidine to which 0.1 ml of acetic acid was added and the mixture heated at 100 °C for 1 hour. The amides thus formed were taken up in CH₂Cl₂ and washed with diluted HCl (to remove excess pyrrolidine) and then

with water. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to obtain the required pyrrolidides.

2.9. Gas chromatography-electron impact mass spectrometry (GC-EIMS) analyses

GC-EIMS analyses were carried out with a HP 5890 Series II Plus gas chromatograph connected to a HP 5972 mass spectrometer. The following operating conditions were employed: 30 m x 0.25 mm (i.d.) fused silica capillary column coated with SOLGEL-1 (SGE; 0.25 µm film thickness); oven temperature programmed from 60 °C to 130 °C at 20 °C min⁻¹ and then from 130 °C to 300 °C at 4 °C min⁻¹, carrier gas (He) maintained at 1.04 bar until the end of the temperature program and then programmed from 1.04 bar to 1.50 bar at 0.05 bar min⁻¹; injector (splitless) temperature, 250 °C; electron energy, 70 eV; source temperature, 170 °C; cycle time, 1.5 s.

3. Results and discussion

Seven bacterial strains were previously isolated from healthy cells of *E. huxleyi* strain TWP1 and identified as *Dietzia maris* sp. S1, *Stappia* sp. AG2, *Nocardioides* sp. S3, *Sphingomonas* sp. AG6, *Oceanicaulis alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7 and *Micrococcus* sp. AG10 (Zabeti *et al.*, 2010b).

The total fatty acid (TFA) contents of the different bacterial strains ranged from 0.3% to 4% dry wt. (Table III-1). Many authors have used polar lipid derived fatty acids (PLFA) as a proxy for bacterial biomass estimation in sediments (e.g. Rajendran *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 2006). These estimates are based on an averaged PLFA content (for bacteria of the size of *Escherichia coli*) of 100 µmol PLFA/g dry wt. (Rajendran *et al.*, 1991) equivalent to 2-3% dry weight. Though the amounts of lipids extracted may depend on the extraction method employed, the range of variation of TFA observed between the different strains investigated here suggests a greater degree of variation and hence larger uncertainty in such estimations.

There are numerous reports of the use of fatty acids as biomarkers of bacteria in sediments (e.g. Volkman *et al.*, 1980b; Taylor & Parkes, 1983, 1985), microbial mats (e.g. Grimalt *et al.*, 1992; Rontani & Volkman, 2005) and particulate matter (e.g. Wakeham & Beier, 1991). Typical bacterial straight-chain fatty acid profiles contain saturated and monounsaturated fatty

acids (FA) ranging from C₁₂ to C₂₀ (Harwood & Russell, 1984). As a general rule, odd-numbered FA are considered to be bacterial markers (Goossens *et al.*, 1989) but, as we show here, fatty acids with an even carbon number are also common and abundant.

Table III-1. FA composition of bacterial strains isolated from *E. huxleyi* strain TWPI cells (*tr* =trace).

Fatty acid	<i>D. maris</i> sp. S1	<i>Stappia</i> sp. AG2	<i>Nocardioides</i> sp. S3	<i>O. alexandrii</i> sp. AG4	<i>Sphingomonas</i> sp. AG6	<i>O. alexandrii</i> sp. AG5789	<i>Micrococcus</i> sp. AG10
Saturated straight-chain							
14:0	1.0	0.3	0.8		0.2	0.2	0.8
15:0	14.4	0.3	0.6		0.1	0.3	0.2
16:0	12.1	4.4	18.5	1.0	6.3	1.4	0.7
17:0	10.7	0.3	2.6	6.2	0.1	22.4	0.3
18:0	0.6	5.9	3.4	12.9	0.5	6.7	
19:0			0.1			6.8	0.1
20:0		0.3					
Monounsaturated straight chain							
16:1 Δ^7			2.4		4.3		
16:1 Δ^9	1.7	8.1	7.2	0.9	10.0	1.0	0.6
16:1 Δ^{10}	3.6						
17:1 Δ^{11}				1.7		13.2	
17:1 Δ^9	20.9		16.1			2.3	0.2
17:1 Δ^{10}	8.1				0.1		
7:1 Δ^7					1.1		
18:1 Δ^9	13.7	2.3	14.2		0.6	0.3	0.3
18:1 Δ^{11}	tr	64.7	3.9	66.0	75.8	24.9	0.3
19:1 Δ^9			0.6				
19:1 Δ^{11}	0.7	0.3	0.9			15.8	
19:1 Δ^{13}				1.2		2.2	
20:1 Δ^{13}		4.5					
Methyl branched							
<i>iso</i> -13:0							1.7
<i>anteiso</i> -13:0							6.2
<i>iso</i> -14:0							10.0
<i>iso</i> -15:0			1.3				10.7
<i>anteiso</i> -15:0		1.7	0.3				65.5
<i>iso</i> -16:0			21.5				1.3
<i>iso</i> -17:0			1.4				0.3
<i>anteiso</i> -17:0		4.7					
10-Me-17:0	5.0						
10-Me-18:0	7.5						
Branched monounsaturated							
<i>iso</i> -16:1 Δ^9			2.2				0.7
<i>iso</i> -17:1 Δ^9			0.7				0.1
<i>iso</i> -18:1 Δ^9			1.0				
<i>iso</i> -18:1 Δ^{11}			0.3				
11-Me-18:1 Δ^{12}		1.8		7.8	0.9	1.1	
Cyclic Furanoid ²		0.4		2.3		1.4	
Total (%/dry weight)	0.9	0.7	0.3	0.7	0.5	4.0	0.7

¹ Relative percentage obtained after silylation of total fatty acid fractions.

² 10,13-Epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid

Apart from a few exceptions, the fatty acid composition of bacteria correlates well with the Gram stain (Harwood & Russell, 1984) and high contents of *iso*- and *anteiso*-FAs are often found in Gram-positive bacteria. *Cis*-vaccenic acid (18:1 Δ^{11}) and cyclopropyl FA (notably 11,12-methyleneoctadecanoic acid), which are present in numerous bacteria, are also considered to be typical bacterial markers (Cranwell, 1973; Perry *et al.*, 1979; Sicre *et al.*, 1988).

All the strains investigated exhibited saturated straight-chain fatty acid profiles ranging from C₁₂ to C₂₀ (Table III-1). Straight-chain 15:0 and 17:0 FA are generally considered to be reliable bacterial markers to describe and quantify bacterial inputs to organic matter in marine sediments (Goossens *et al.*, 1989), although small amounts can be found in many marine organisms. The abundance of these odd-numbered FA in most of the strains (Table III-1) is consistent with this view, but the high proportions of 17:0 observed in *D. maris* sp. S1 and *O. alexandrii* sp. AG7 and of 15:0 in *D. maris* sp. S1 are very unusual.

The biosynthesis of even-numbered saturated fatty acids requires a primer molecule, usually acetic acid in the form of its coenzyme A ester, plus a chain-extender such as malonyl-SCoA. Successive molecules of malonyl-SCoA are added to the single primer molecule of acetyl-SCoA in a sequence of reactions catalyzed by a multifunctional enzyme complex – the fatty acid synthetase (For reviews see Lehninger *et al.*, 2005; Harwood & Russell, 1984; Rawlings, 1998). In the case of odd-chain fatty acids, the primer molecule can be propionyl-SCoA (Lehninger *et al.*, 2005), but these can also be produced from even-numbered components by α -oxidation (Emmanuel, 1978). It was previously demonstrated for several bacterial strains that growth on particular substrates such as propionate or some isoprenoids (the degradation of which by β -oxidation affords several molecules of propionyl-SCoA) could lead to the biosynthesis of high proportions of straight-chain 15:0 and 17:0 FA (Vestal & Perry, 1971; Cerniglia & Perry, 1975; Rontani & Giusti, 1986). However, growth on yeast extract usually mainly induces the biosynthesis of even-numbered 16:0 and 18:0 FA (Doumenq *et al.*, 2001). The production of high proportions of odd-numbered FA observed during the growth of *D. maris* sp. S1 and *O. alexandrii* sp. AG7 on this substrate (Table III-1) could thus be the result of α -oxidation reactions.

Several monounsaturated FA were identified in the different strains investigated (Table III-1). The position of the double bond was deduced from the mass fragmentation patterns of pyrrolidide derivatives. These derivatives were chosen for this study since: (i) they are prepared under relatively mild conditions, (ii) they are stable chemically, and (iii) they are

well suited for the structural characterization of branched and monounsaturated fatty acids. Double bonds occurred mainly at Δ^9 , Δ^{10} , Δ^{11} and Δ^{13} (Table III-1). An unusual finding was the identification of Δ^{10} -unsaturated FA, such as hexadec-10-enoic and heptadec-10-enoic acids, which are rarely found in marine bacteria. All the strains contained the classical 16:1 Δ^9 (palmitoleic), 18:1 Δ^9 (oleic) and 18:1 Δ^{11} (*cis*-vaccenic) acids. *Cis*-vaccenic acid, which predominates over oleic acid in many bacterial strains (Cranwell, 1978; Perry *et al.*, 1979; Barouxis *et al.*, 1988), is thus generally considered as a typical bacterial marker (Sicre *et al.*, 1988). While this acid is present in higher proportions than oleic acid in *Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4, *Sphingomonas* sp. AG6 and *O. alexandrii* sp. AG7 (notably in the case of *Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4 and *Sphingomonas* sp. AG6, where it reached 65-76% of total FA; Table III-1), the reverse is true for *D. maris* sp. S1 and *Nocardioides* sp. S3. Other examples of fatty acid profiles exhibiting oleic/vaccenic acid ratios > 1 are known from the literature (e.g. Aries *et al.*, 2001; Doumenq *et al.*, 2001), so a predominance of oleic acid over *cis*-vaccenic acid need not reflect a low bacterial contribution, especially if other bacterial markers are present.

High levels of *cis*-vaccenic acid, known to be formed through the anaerobic FA desaturase pathway, have been used as evidence for the presence of anaerobic bacteria (White *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2006). However, it is well known that some aerobic and facultative aerobic bacteria also possess this anaerobic desaturation pathway (Harwood & Russell, 1984) and can thus contain high levels of this acid as shown in the FA profiles of strains *Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4 and *Sphingomonas* sp. AG6 (Table III-1).

Relatively high proportions of three isomeric 17:1 FA were observed in some of the strains analyzed (heptadec-9-enoic acid in *D. maris* sp. S1, heptadec-10-enoic acid in *D. maris* sp. S1 and *Nocardioides* sp. S3 and heptadec-11-enoic acid in *O. alexandrii* sp. AG4 and *O. alexandrii* sp. AG7; Table III-1). Heptadec-11-enoic acid, which is generally considered as characteristic of *Desulfobulbus* and other related species (Taylor & Parkes, 1983; Knoblauch *et al.*, 1999), is now shown to be present in bacteria belonging to the genus *Oceanicaulis*. There are very few reports of the presence of heptadec-10-enoic acid in bacteria. To our knowledge, only Kamimura *et al.* (1992) detected this compound in a barotolerant *Alteromonas*. Heptadec-9-enoic acid was observed in *Erwinia* strains collected from cacti (Alcorn *et al.*, 1991) and in *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens* (Khashe & Janda, 1998).

We detected 10-methylheptadecanoic and 10-methyloctadecanoic (tuberculostearic) acids in *D. maris* sp. S1, and *iso*-branched-13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0 and *anteiso*-branched 13:0, 15:0, 17:0 FA in *Stappia* sp. AG2, *Nocardioides* sp. S3 and *Micrococcus* sp. AG10 (Table III-1). Note that *anteiso*-branched FA are exclusively odd-chained. Tuberculostearic acid is a well-known marker for diverse groups of mycolate-containing bacteria, i.e. genera *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Gordonia* and *Nocardia* (Hung & Walker, 1970; Suutari & Lasko, 1993). The biosynthesis of this branched-chain fatty acid involves methylation of oleic acid with *S*-adenosylmethionine as the methyl donor, the resulting 10-methyleneoctadecanoyl residue being then reduced to the 10-methyl compound with NADPH as the cofactor.

10-Methylheptadecanoic acid is relatively uncommon in bacteria. It was previously detected in relatively low amounts in *Rhodococcus opacus* (Zaitsev *et al.*, 1995) and in a consortium of marine hydrocarbon-degrading bacteria (Aries *et al.*, 2001). The biosynthesis of this compound by *D. maris* sp. S1 likely results from the methylation of heptadec-9-enoic acid present in this strain.

Iso- and *anteiso*-branched 15:0 and 17:0 FA are abundant in some sulphate-reducing bacteria (Grimalt *et al.*, 1992), but are also found in other bacterial groups (for a review see Kaneda, 1991). C₁₄-C₁₇ *iso*- and *anteiso*-FAs are produced biosynthetically via the conventional mechanisms for the synthesis of saturated fatty acids in bacteria, except that the primer molecule differs. 2-Methylpropanyl-CoA (derived from the amino acid L-valine) is the primer for the biosynthesis of *iso*-branched fatty acids with an even number of carbon atoms, while 3-methylbutyryl-CoA (derived from L-leucine) is the primer for *iso*-FAs with an odd number of carbon atoms. 2-Methylbutyryl-CoA (derived from L-*iso*-leucine) is the primer for *anteiso*-FAs to produce FAs with an odd number of carbon atoms. On the basis of their detection in several bacteria, branched FAs (and notably *iso*- and *anteiso*-branched 15:0 and 17:0) are commonly used as bacterial markers (Parkes & Taylor, 1983; Saliot *et al.*, 1991; Zegouagh *et al.*, 2000). However, numerous bacteria do not contain such FAs, as is the case for *D. maris* sp. S1, *O. alexandrii* sp. AG4, *Sphingomonas* sp. AG6 and *O. alexandrii* sp. AG7 investigated in the present work (Table III-1). Any estimation of bacterial contribution to sediments will thus be an underestimate if only these branched-chain fatty acids are used (Teece *et al.*, 1999). Harvey & Macko (1997) suggested that the detection of such bacterial markers in sediments should be considered as only a qualitative tool for the estimation of bacterial contribution. Indeed, Volkman and Johns (1977) found high bacterial contributions to straight-chain saturated and unsaturated fatty acids in an intertidal sediment, even though branched-chain

fatty acids were not particularly abundant. The predominance of the *iso*-branched 16:0 fatty acid is generally considered as a characteristic of the genus *Nocardioides* (O'Donnell *et al.*, 1982; Dastager *et al.*, 2008). The high proportion of this fatty acid detected in the strain *Nocardioides* sp. S3 (Table III-1) is consistent with this view, but we note that small amounts of *iso*-16:0 can be found in a wider variety of species.

11-Methyloctadec-12-enoic acid was previously detected in significant proportions in several bacteria including mycobacteria (Couderc, 1995), *Shewanella putrefaciens* (Shirasaka *et al.*, 1997), *Thiobacillus* (Kerger *et al.*, 1986), *Thiohalocapsa halophila* and *Halochromatium salexigens* (Rontani, J.-F., unpublished data) and in different strains of the genus *Roseobacter*, *Erythrobacter* and *Citromicrobium* (Rontani *et al.*, 2005b). Its detection in four of the strains investigated (Table III-1) confirms that this compound is a typical fatty acid of bacteria. It is interesting to note that 11-methyloctadec-12-enoic acid was detected in *Stappia* sp. AG2, while the main monounsaturated branched fatty acid previously detected in bacteria belonging to this genus was 11-methyloctadec-11-enoic acid (Kim *et al.*, 2006; Weber & King, 2007). We suggest that these discrepancies might be due to previous erroneous attributions of the double bond position. Indeed, under electron bombardment the double bond of monounsaturated branched fatty acids migrates readily towards the methyl branch and the fragment ions resulting from cleavage of the methyldiene double bond thus formed may be the source of misinterpretation (Rontani *et al.*, 2009a). Consequently, unambiguous attribution of double bond positions of such compound needs additional treatments which “fix” the double bond such as OsO₄ oxidation, DMDS addition, pyrrolidide (as in the present work), DMOX or picolinyl derivative formation.

An interesting furan FA (10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid) was detected in three of the bacterial strains investigated (Table III-1). This compound was previously detected in several strains of marine bacteria (*Shewanella putrefaciens*, *Listonella anguillarum*, *Marinomonas communis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter agglomerans*) (Shirasaka *et al.*, 1995; 1997). Based on the presence of particular intermediates, but without labelling experiments, it was previously proposed that in marine bacteria 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid is synthesized according to the pathways shown in figure III-1 (Shirasaka *et al.*, 1997). The first step of this pathway is thought to be the formation of 11-methyloctadec-12-enoic acid through methylation of *cis*-vaccenic acid and then 11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid is produced through further desaturation. The next step involves a lipoxygenase-type oxidation, followed by ring closure. The involvement of such a process in the strains investigated is well supported by the

presence of relatively high proportions of 11-methyloctadec-12-enoic acid in the three strains containing this furan acid (Table III-1). However, the intermediate 11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid, which was previously detected by Shirasaka *et al.* (1997), was not observed in these strains.

In order to confirm the proposed pathway, we cultured *O. alexandrii* sp. AG4 (containing the highest proportions of 11-methyloctadec-12-enoic and furan acids; Table III-1) supplemented with [methyl-D₃]L-methionine (Couderc, 1995). The mass spectrum of 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid trimethylsilyl ether derivative exhibits a molecular peak at m/z 380 and fragment ions at m/z 165 and 323 resulting from allylic cleavages of the alkylcarboxylic chain and the alkyl chain, respectively (Fig. III-2A). The shift of these peaks to m/z 383, 168 and 326 observed in the mass spectrum of the furan FA obtained after growth of *O. alexandrii* sp. AG4 on [methyl-D₃]L-methionine-containing medium (Fig. III-2B) demonstrates that in bacteria (as was previously shown for algae and plants; for a review see Spiteller, 2005), the methyl group in the β -position of the furan ring also originates from methionine. The labeling of the methyl branch of 11-methyloctadec-12-enoic acid (Fig. III-3) allowed us to confirm that this FA arises from the methionine-mediated methylation of *cis*-vaccenic acid and well supports the previously proposed role of this compound as the precursor of 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid (Shirasaka *et al.*, 1997). It is important to note that this furan fatty acid is also produced (from linolenic acid) by algae, plants, yeasts, fungi, mammals... (for a review see Spiteller, 2005). Due to this lack of specificity its use as bacteria biomarker should be excluded.

Different distributions of 3-hydroxyacids (ranging from C₁₁ to C₁₈) were detected in *Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7 and *Micrococcus* sp. AG10. These compounds, which are typically produced as intermediates in the β -oxidation of monocarboxylic acids, constitute classical components of the cell wall lipopolysaccharides of several Gram-negative bacteria (Klok *et al.*, 1988). These compounds have previously been used as an assay for Gram-negative bacteria in sediments (Parker *et al.*, 1982), but it should be noted that 3-hydroxyacids are not specific to these bacteria. Indeed, they have been detected in a few Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis* (Wakeham *et al.*, 2003) and *Lactobacillus plantarum* (Sjögren *et al.*, 2003). The detection of significant amounts of 3-hydroxyacids (dominated by *iso*- and *anteiso*-branched C_{15:0}) in *Micrococcus* sp. AG10 confirms this lack of specificity.

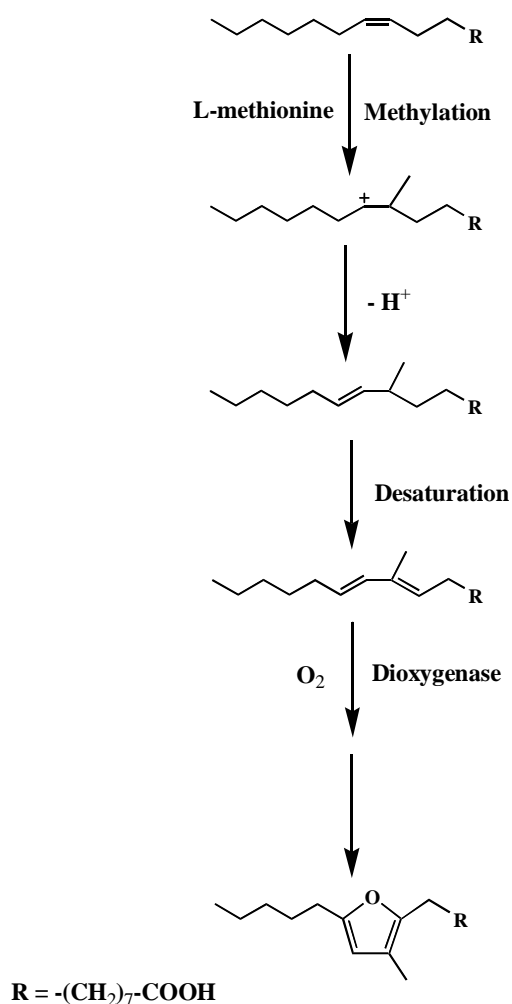


Fig. III-1. Proposed formation pathways of 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid from cis-vaccenic acid (adapted from Shirasaka et al., 1997).

Members of the Sphingomonadaceae are generally characterized by the presence of sphingolipids and 2-hydroxyacids (Busse *et al.*, 1999). *Sphingomonas* sp. AG6 contains C₁₄-C₁₆ 2-hydroxyacids (strongly dominated by 2-hydroxytetradecanoic acid). The content of 2-hydroxyacids increases significantly when acidic hydrolysis is carried out after saponification. This suggests that these compounds are components of sphingolipidic structures linked to sphingosine by amide bonds, which are only partially hydrolyzed during saponification.

A

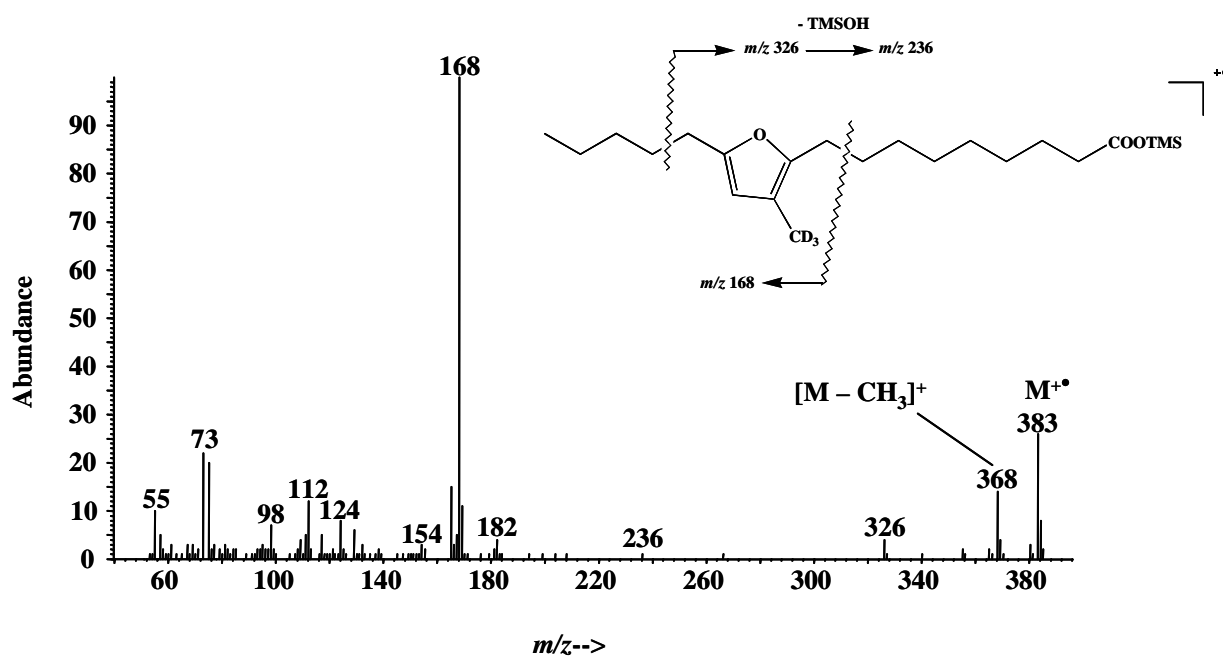
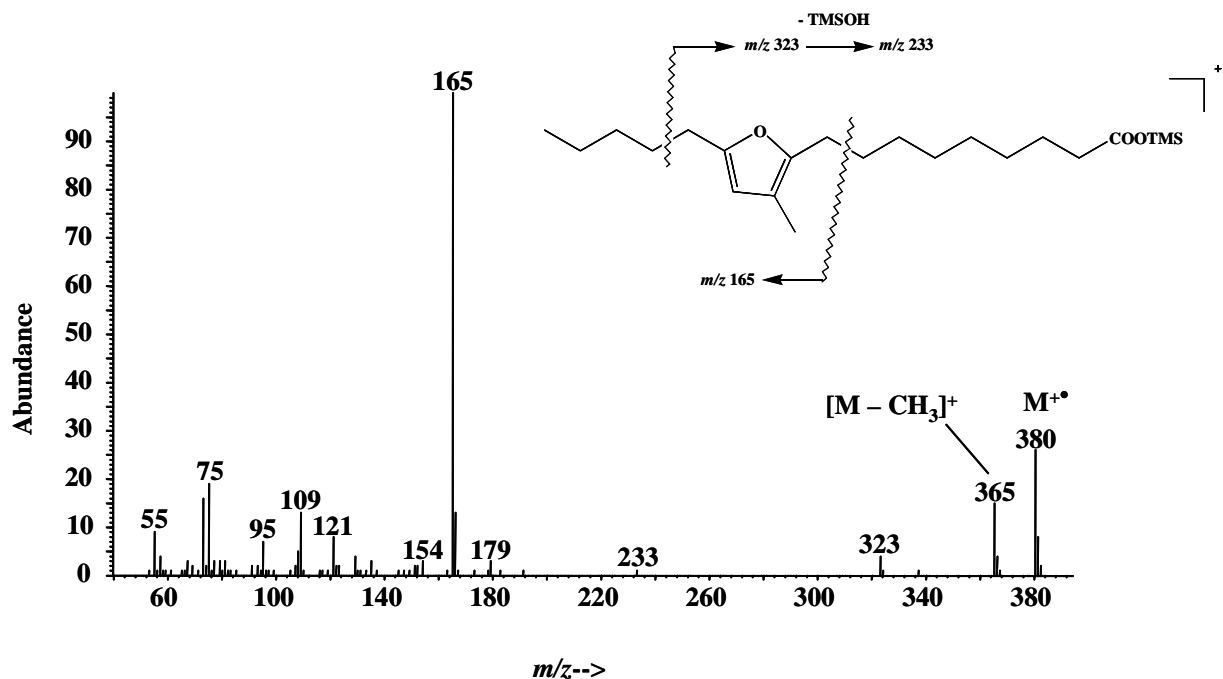
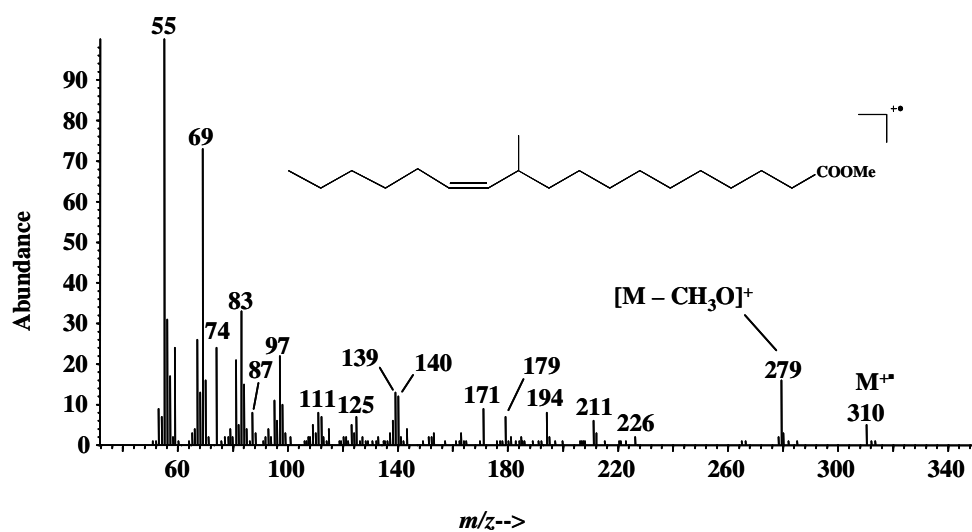
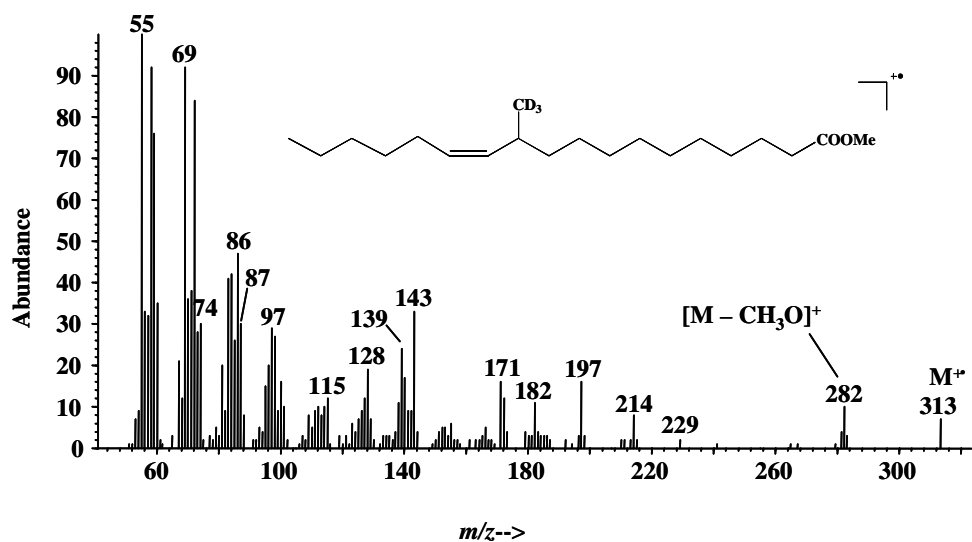


Fig. III-2. EI mass spectra of trimethylsilyl ester derivatives of 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic fatty acid (A) and 10,13-epoxy-11(Δ^3)-methyloctadeca-10,12-dienoic FA (B).

A



B



C

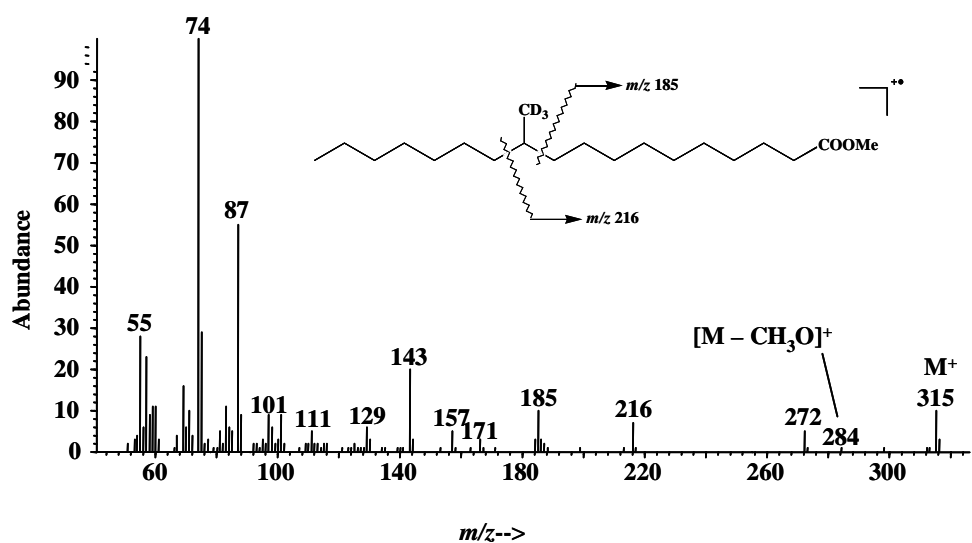


Fig. III- 3. EI mass spectra of methyl esters of 11-methyloctadec-12-enoic fatty acid (A); (11- Δ 3)-methyloctadec-12-enoic fatty acid (B); and (11- Δ 3)-methyloctadecanoic FA (obtained after catalytic hydrogenation of the corresponding unsaturated acid) (C).

Mycolic acids (3-hydroxyl long-chain fatty acids substituted at the 2-position with a moderately long aliphatic chain) were detected in the strain *D. maris* sp. S1 (Table III-2). Mass spectra of trimethylsilyl ether derivatives of mycolic acids (Fig. III-4) exhibited a significant peak corresponding to $[M-CH_3]^+$ from which the molecular weight of the corresponding acid could be deduced. Very informative fragment ions result from cleavages A and B in α position relative to the trimethylsilyl ether group (Nishiuchi *et al.*, 1999) (Fig. III-4). The fragment ions resulting from cleavage A of the C_{3-4} bond gave information about the number of carbon atoms and double bonds of the main chain, while the fragments arising from cleavage B of the C_{2-3} bond enabled characterisation of the α -branched alkyl chain (Fig. III-4). The loss of CHO from the fragment ions resulting from cleavage A probably involves initial trimethylsilyl transfer from the ionized ether oxygen to the ester group (Fig. III-4) (Rontani & Aubert, 2008), which is strongly favoured in this case (six-membered-ring transition state).

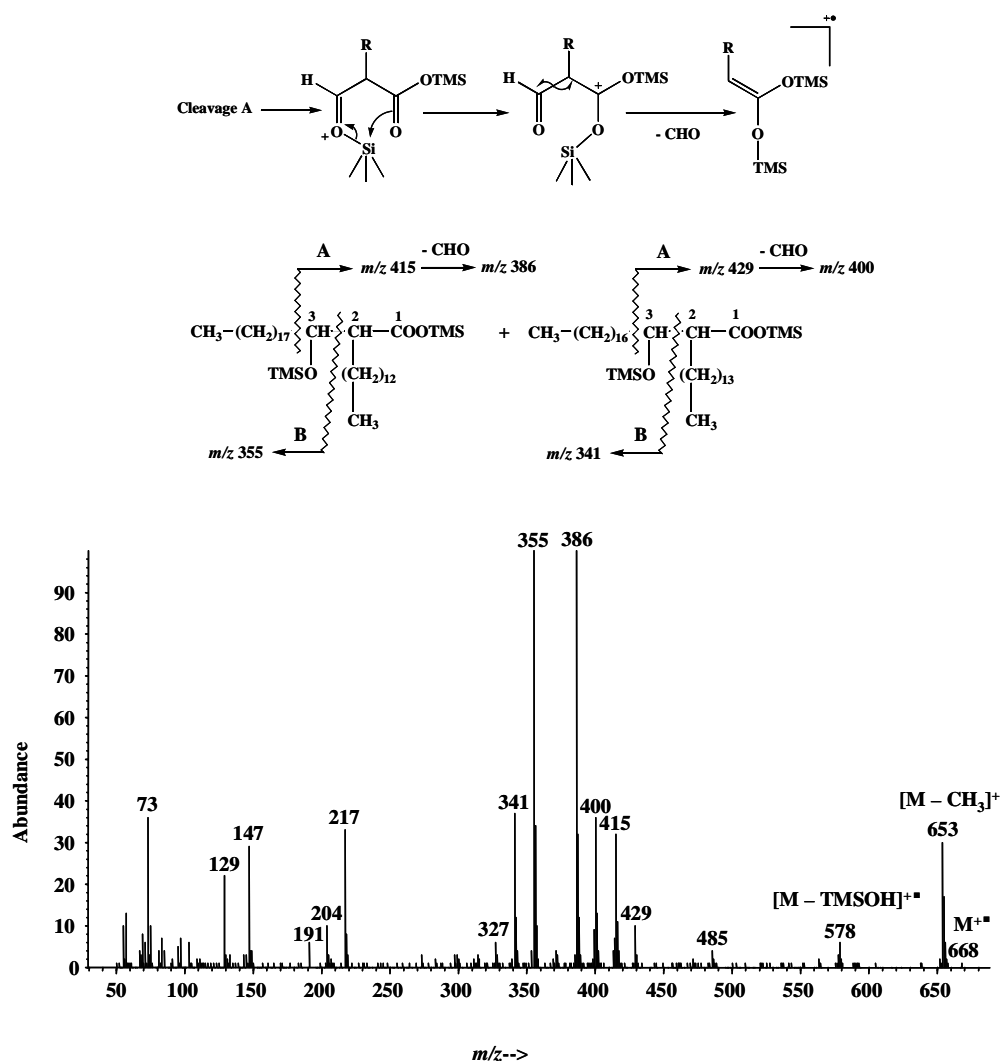
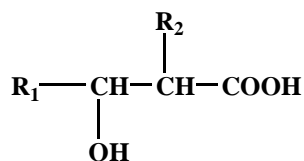


Fig. III- 4. EI mass spectrum of trimethylsilyl ether/ester derivatives of isomeric C_{34} mycolic acids.

Table III-2. Mycolic acid composition of strain *D. maris* sp. S1.



Carbon number	Number of double bonds	Main-chain (R ₁ + 3)	Side-chain (R ₂)	Relative percentage
32	0	20:0	12:0	tr ^a
33	1	20:0	13:1	tr
33	1	21:1	12:0	tr
33	0	20:0	13:0	1.1
33	0	21:0	12:0	5.0
34	1	20:0	14:1	1.5
34	1	21:1	13:0	4.7
34	0	20:0	14:0	4.6
34	0	21:0	13:0	13.8
35	2	21:1	14:1	3.0
35	1	20:0	15:1	2.3
35	1	21:0	14:1	6.7
35	1	21:1	14:0	2.9
35	1	22:0	13:1	1.7
35	0	20:0	15:0	3.3
35	0	21:0	14:0	7.9
35	0	22:0	13:0	1.1
36	2	21:1	15:1	5.1
36	2	22:1	14:1	1.1
36	1	21:0	15:1	13.3
36	1	21:1	15:0	6.7
36	1	22:1	14:0	3.5
36	0	21:0	15:0	9.4
36	0	22:0	14:0	1.3
37	2	22:1	15:1	tr
37	1	22:0	15:1	tr
37	1	22:1	15:0	tr
37	0	21:0	16:0	tr
37	0	22:0	15:0	tr

^a Trace amounts (< 1%)

Mycolic acids are the most characteristic components of the cell wall of *Actinomycetales*, such as the genera *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Tsakamurella* and *Dietzia* (Nishiuchi *et al.*, 1999). Mycolic acids have a wide range of chain-lengths and a variable number of double bonds and functional groups depending on the species or the

genera considered (Minnikin & Goodfellow, 1981; Brennan, 1988). The genus *Dietzia* was previously found to have its own characteristic mycolic acid composition (Nishiuchi *et al.*, 2000). The mycolic acids of *D. maris* strain 58001 (ranging from C₃₀ to C₃₈) are characterized by an almost equal amount of even- and odd-numbered carbon chains and by the dominance of saturated acids (98%) (Nishiuchi *et al.*, 2000). Surprisingly, the strain *D. maris* sp. S1 analysed here exhibits a mycolic acid composition (Table III-2) quite distinct from that of *D. maris* strain 58001, with its high proportions of: (i) mono- and di-unsaturated acids (> 52%) and (ii) odd-numbered carbon main-chains (> 78% being C₂₁; Table III-2). The presence of a high proportion of mycolic acids with a C₂₁ main-chain in *D. maris* sp. S1 may be related to the high odd-numbered carbon fatty acid content of this strain (notably of C_{17:0} and C_{17:1}) (Table III-1). Classical elongation of these fatty acids by the addition of malonyl-CoA thus constitutes a likely formation pathway for the main-chain of these mycolic acids.

We were unable to detect mycolic acids in *Nocardioides* sp. S3. The lack of these compounds in this strain is to be expected since members of the genus *Nocardioides* can be distinguished from other members of the Actinobacteria by their lack of mycolic acids (Prauser, 1976).

4. Conclusions

Seven bacterial strains belonging to the genus *Dietzia*, *Stappia*, *Nocardioides*, *Oceanicaulis*, *Sphingomonas* and *Micrococcus*, widely distributed in the marine environment (e.g. Schut *et al.*, 1997; Colquhoun *et al.*, 1998; Strömpl *et al.*, 2003; Agogué *et al.*, 2005; Pujalte *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Weber & King, 2007; Park *et al.*, 2008) were isolated from living cells of the haptophyte *E. huxleyi* (Zabeti *et al.*, 2010b). These different strains contain a great variety of saturated and monounsaturated straight-chain and methyl-branched fatty acids. Deuterium labeling experiments allowed us to confirm that 11-methyloctadec-12-enoic acid arises from the methionine-mediated methylation of *cis*-vaccenic acid and well supports the previously proposed role of this compound as the precursor of the furan fatty acid 10,13-epoxy-11-methyloctadeca-10,12-dienoic acid.

The strain *Sphingomonas* sp. AG6 contains C₁₄-C₁₆ 2-hydroxyacids (strongly dominated by 2-hydroxytetradecanoic acid), which are typical components of sphingolipidic structures linked to sphingosine by amide bonds. In contrast, C₁₁ to C₁₈ 3-hydroxyacids detected in *Stappia* sp. AG2, *O. alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7 and *Micrococcus* sp. AG10 are likely to

be components of the cell wall lipopolysaccharides. C₃₂-C₃₇ mycolic acids were detected in the strain *D. maris* sp. S1. These compounds exhibit an unusually high degree of unsaturation and dominance of odd-numbered carbon main chains (> 78% of which are C₂₁).

These results highlight the close association of different bacterial types with this geochemically important alga. These bacteria are intimately connected with the algal cells when they die and thus may play a prime role in degradation of the cell's organic constituents. The fact that most of the isolated bacteria were able to grow on alkenones (Zabeti et al, 2010b) provides strong support for the association of these bacterial strains with alkenone-producing haptophytes and thus with *E. huxleyi* cells in the marine environment.

Acknowledgements

The authors acknowledge support of this work by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de la Méditerranée. Thanks are due to two anonymous referees for their useful and constructive comments.

CHAPITRE IV

**Devenir des lipides dans le matériel particulaire
en suspension du nord-ouest de la mer
Méditerranée : Dégradation biotique et abiotique
des stérols et des alcénones.**

AVANT-PROPOS

Lors d'expérimentation *in vitro*, il a été mis en évidence que plusieurs processus pouvaient entraîner une dégradation plus ou moins importante des alcénones (Cf. Ch. I. 5 et 6 et Ch. II). Cette dégradation peut être d'origine biotique (dégradation bactérienne sélective et non-sélective), abiotique (photo-oxydation et autoxydation) ou encore due à des processus de stéréomutation (isomérisation *cis/trans* des doubles liaisons). Celle-ci pouvant conduire à une altération significative de l'indice $U_{37}^{K'}$. Cependant, il est toujours délicat d'extrapoler les résultats d'expérimentations *in vitro* au milieu naturel et nous ne pouvions donc pas affirmer que ces processus pouvaient avoir un impact significatif sur les estimations de paléotempératures. En effet, à l'exception d'une étude préliminaire sur ces phénomènes en mer Noire (Cf. Ch. I-6), nos connaissances sur l'existence et l'importance de ces processus en milieu naturel restaient limitées.

L'étape suivante de ma thèse a donc consisté à étudier ces processus de dégradation (biotique, abiotique et de stéréomutation) *in situ*. Dans ce but, nous avons analysé en CPG-SMEI divers échantillons de matériel particulaire ou de sédiments provenant de zones géographiques bien distinctes.

Ce chapitre expose les résultats obtenus lors de l'analyse d'échantillons de particules en suspension et de sédiments de surface collectés dans le nord-ouest de la mer Méditerranée dans le cadre du programme Medflux (Station Dyfamed, mer Ligure).

Si au début de cette étude nous possédions des marqueurs spécifiques de la biodégradation et de la stéréomutation des alcénones, aucun traceur d'autoxydation suffisamment stable n'était disponible. L'utilisation de traceurs "indirects" est alors apparue nécessaire. Sur la base de leur relative stabilité et de leur spécificité, notre choix s'est porté sur les produits de dégradation des Δ^5 -stérols.

Nos analyses ont montré que les concentrations en alcénones et en Δ^5 -stérols diminuaient fortement (\approx 500 fois et 100 fois respectivement) avec la profondeur (entre 5 et 800 m) suggérant une dégradation importante le long de la colonne d'eau. Les produits de dégradation des Δ^5 -stérols ont permis de montrer la très forte dominance des processus de dégradation abiotique dans les particules en suspension de la région nord-ouest de la mer Méditerranée.

Des alcénones de condensation en atomes de carbone allant de 36 à 39 ont été détectées dans nos échantillons. L'indice $U_{37}^{K'}$ s'est révélé augmenter de 0,43 à 0,55 avec la profondeur (ce qui est équivalent à une augmentation de température de 3.2°C). La dégradation biotique sélective des alcénones est apparue peu significative. L'excellente corrélation observée entre les variations des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et les concentrations des produits d'autoxydation des Δ^5 -stérols, nous a permis d'attribuer les variations de cet indice à une forte dégradation autoxydative sélective des alcénones.

De plus, des alcénones stéréomutées (possédant des doubles liaisons *cis*) ont pu être détectées à la surface du sédiment. L'augmentation de l'indice $U_{37}^{K'}$ résultant de la stéréomutation des alcénones a pu être estimée à +0,05 (équivalente à une augmentation de température de +1,3°C).

Ces différents résultats ont permis de confirmer que lors de leur diagenèse, les alcénones pouvaient subir une dégradation sélective (autoxydation et stéréomutation) pouvant entraîner un impact significatif sur les reconstructions de paléotempératures.

The fate of marine lipids: Biotic vs. abiotic degradation of particulate sterols and alkenones in the northwestern Mediterranean Sea

Rontani, J.-F., Zabeti, N., Wakeham, S.G.

Marine Chemistry (2009b), **113** : 9-18

ABSTRACT

Sterol and alkenone compositions in suspended particle and surface sediment samples collected in the northwestern Mediterranean Sea during the MEDFLUX program were used to evaluate the relative importance of biotic and abiotic degradation processes on marine organic matter. Alkenone concentrations decreased much more rapidly (~500 fold) between 5 and 800 m than Δ^5 -sterols (49-fold) or POC (25-fold). The diverse functional groups attached to the stable tetracyclic carbon skeleton of Δ^5 -sterols appeared to be useful for estimating the relative effects of biotic vs. abiotic (photooxidation and autoxidation) degradation. Products of abiotic degradation predominated over products of biotic degradation in suspended particles in the NW Mediterranean. For alkenones, the $U_{37}^{K'}$ index increased from 0.43 to 0.55 with increasing water depth, and a good correlation between variations of $U_{37}^{K'}$ and concentrations of specific Δ^5 -sterol autoxidation products points to selective autoxidation of alkenones in suspended particles. Stereomutated alkenones (with *cis* double bonds) were detected in the surface sediment, allowing us to estimate that stereomutation resulted in a +0.05 increase in $U_{37}^{K'}$. Therefore, abiotic degradation may be another factor effect on alkenone-derived paleothermometry.

Keywords: NW Mediterranean Sea; Suspended particles; Biotic and abiotic degradation; Δ^5 -sterols; Alkenones; Autoxidation; Stereomutation.

1. Introduction

Understanding the biogeochemical cycle of carbon in the ocean requires identifying not only the sources of particulate organic matter (POM) but also those processes responsible for its alteration. Most studies of the alteration of POM have focussed on biotic degradation, but the potential impact of abiotic photooxidation and autoxidation is less well understood owing to the lack of adequate tracers. Nonetheless, photooxidation by photosynthetically active radiation (PAR) and autoxidation [free radical-mediated oxidation via homolytic cleavage of photochemically produced hydroperoxides catalyzed by some metal ions (Pokorny, 1987; Schaich, 1992)][§] can degrade common marine lipids, including unsaturated fatty acids, the phytyl side-chain of chlorophyll, sterols and alkenones. Chlorophyll-sensitized photooxidation can be important within the euphotic layer, whereas autoxidation may occur throughout the water column and in oxic sediments. Photodegradation and autoxidation may yield diagnostic products (for a review see Rontani, 2008). In the case of alkenones, autoxidation may alter significantly their unsaturation ratio and thus constitute a source of uncertainty during paleotemperature reconstruction (Rontani *et al.*, 2006b, 2007b). Unfortunately, tracers allowing direct estimates of autoxidative alterations of alkenones are lacking.

Significant photooxidative and autoxidative alteration of fast sinking organic matter collected by sediment traps at the DYFAMED station (northwestern Mediterranean Sea) have been documented using newly identified tracers (Marchand *et al.*, 2005; Rontani *et al.*, 2006b). We now hypothesize that effects of abiotic degradation should be amplified in suspended particles due to their slower sinking rates and higher residence time in the water column. To further evaluate the importance of abiotic degradation on marine organic matter, we have now investigated suspended particles in the NW Mediterranean within the framework of the MEDFLUX program (<http://www.msrb.sunysb.edu/MedFlux/>). Because sterols are excellent biomarkers for tracing diagenetic transformation of organic matter (Mackenzie *et al.*, 1982; Volkman, 1986; Wakeham & Beier, 1991), we used their oxidation products to determine the relative roles of biotic and abiotic degradation. Using our observations of POM degradation derived from sterols, we then examined how abiotic degradation might affect the fate of alkenones, and thus the paleotemperature proxy $U_{37}^{K'}$, in the northwestern Mediterranean.

[§] Les références bibliographiques ont été centralisées à la fin du manuscrit

2. Material and methods

2.1. Collection of the samples

Suspended particle samples were collected in the northwestern Mediterranean Sea 52 km off Nice, France at 43°25' N, 07°52'E during MedFlux (R/V *Tethys II*, May, 2006; cruise). MedFlux was a multidisciplinary investigation designed to determine and model relationships between organic matter and mineral ballast in particulate matter in the ocean (Lee *et al.*, 2009a, and associated Special MedFlux issue of Deep-Sea Research II). The MedFlux site was located at the French Joint Global Ocean Flux Studies DYFAMED time-series site (Marty 2002, and references therein). Located in the central Ligurian Sea and with a water depth of ~2300 m, the MedFlux/DYFAMED site is thought to be isolated from advection of coastal riverine and resuspended sediments (Durrieu de Madron *et al.*, 1990), although sediment trap experiments suggest there might be some periods of advective flux at depths of 1000 m or more (Lee *et al.*, 2009b). Plankton succession has been described and generally consists of a spring diatom bloom followed by oligotrophic summer conditions (Marty *et al.*, 2002), with corresponding temporal variability in particle flux (Miquel *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2009b).

Particulate matter samples for lipid analyses were collected the 10 May using a large-volume Challenger in situ filtration system (Cochran *et al.*, 2008). Seawater (500-800 l) from 5, 20, 40, 80, 100, 125, 150, 400 and 800 m was first passed through a 53 μm screen to remove rapidly sinking (large) particles. Slowly sinking small ("suspended") particles were collected on 293 mm combusted (500°C, 6 hr) glass fiber filters (Whatman type A/E) of nominal pore size of 0.7 μm . GFF filters were cut in half and one-half was analyzed for lipids; the >53 μm screens were not analyzed. Filters were frozen (-20°C) until analysis. Surface sediments were collected by box coring at the MedFlux site and stored frozen until analysis.

Particulate organic carbon (POC) was measured on HCl-fumed plugs from the filters using a Carlo Erba 1602 CHN analyzer. Chlorophyll a concentrations were obtained from fluorescence data obtained by CDT casts during the sampling.

2.2. Chemical treatments

Chemical treatments of the samples involved Soxhlet extraction of lipids and subsequent NaBH₄-reduction of the lipid extracts thus obtained in order to reduce labile hydroperoxides resulting from photooxidative and autoxidative processes to alcohols. During this treatment, ketones (and notably alkenones) are also reduced to the corresponding alcohols (or alkenols) and the possibility of some ester cleavage cannot be excluded.

2.2.1. Lipid extraction

Filters or freeze-dried sediments (7.6 gdw) were extracted using dichloromethane:methanol (DCM:MeOH; 9:1 v:v) in soxhlet extractors for 8 hr. Lipids were partitioned into DCM with 5% NaCl solution and dried over Na₂SO₄. Following rotary evaporation to concentrate the extracts, samples were stored at -20°C until being split for multiple analyses (Wakeham *et al.* 2008).

2.2.2. NaBH₄ reduction

Total lipid extracts were reduced (20 min) in Et₂O/CH₃OH (3:1, v/v, 5 ml) using excess NaBH₄ (10 mg/mg of extract). After reduction, a saturated solution of NH₄Cl (10 ml) was added cautiously to destroy excess reagent, the pH was adjusted to 1 with dilute HCl (2 N) and the mixture was shaken and extracted with hexane:CHCl₃ (4:1, v/v; x3). The combined extracts were dried as described above and evaporated to dryness under a stream of nitrogen.

2.2.3. Alkaline hydrolysis

Saponification was carried out on reduced samples. After NaBH₄ reduction, 25 ml of water and 2.8 g of potassium hydroxide were added and the mixture was directly saponified by refluxing for 2 h. After cooling, the contents of the flask were acidified with hydrochloric acid (pH 1) and subsequently extracted three times with dichloromethane. The combined dichloromethane extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated by rotary evaporation at 40 °C.

2.2.4. Derivatisation

After solvent evaporation, residues were taken up in 400 μL of a mixture of pyridine and pure N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA; Supelco) (3:1, v/v) and silylated for 1 h at 50°C. After evaporation to dryness under a stream of N_2 , the derivatized residues were taken up in a mixture of ethyl acetate and BSTFA (to avoid desilylation of fatty acids) for analysis using gas chromatography-mass spectrometry.

2.2.5. Identification and quantification of sterols and alkenones and their degradation products by Gas Chromatography - Electron Impact Mass Spectrometry (GC-EIMS)

Compounds were identified by comparison of retention times and mass spectra with those of standards and quantified (calibration with external standards) by GC-EIMS. For low concentrations, or in the case of co-elutions, quantification was achieved using selected ion monitoring (SIM). The main characteristic mass fragment ions used to quantify degradation products of sterols are shown in figure 1. GC-EIMS was carried out with an Agilent 6890 gas chromatograph connected to an Agilent 5973 Inert mass spectrometer. The following conditions were employed: 30 m x 0.25 mm (i.d.) fused silica capillary column coated with SOLGEL-1 (SGE; 0.25 μm film thickness); oven temperature programmed from 70°C to 130°C at 20°C min^{-1} , from 130°C to 250°C at 5°C min^{-1} and then from 250°C to 300°C at 3°C min^{-1} ; carrier gas (He) maintained at 0.69 bar until the end of the temperature program and then programmed from 0.69 bar to 1.49 bar at 0.04 bar min^{-1} ; injector (on column with retention gap) temperature, 50°C; electron energy, 70 eV; source temperature, 190°C; cycle time, 1.99 cycles s^{-1} , scan range, 50-800.

2.2.6. Standard degradation products

5 α - and 6 α/β -Hydroperoxides were obtained after photosensitized oxidation of the corresponding Δ^5 -stenols in pyridine in the presence of haematoporphyrin as sensitizer (Nickon & Bagli, 1961). Allylic rearrangement of 5 α -hydroperoxides to 7 α -hydroperoxides and epimerization of the latter to 7 β -hydroperoxides was carried out at room temperature in chloroform (Teng *et al.*, 1973). Subsequent reduction of these different hydroperoxides in methanol with excess NaBH_4 afforded the corresponding diols. Treatment of Δ^5 -stenols with

meta-chloroperoxy-benzoic acid in dry methylene chloride yielded a mixture of 5 α ,6 α - and 5 β ,6 β -epoxides.

Tests carried out after NaBH₄ reduction and alkaline hydrolysis showed no significant differences in the proportions of sterol degradation products. The results discussed below for free sterols could thus be extended to the composite of free + esterified sterols.

3. Results and discussion

3.1. Δ^5 -sterol distributions and sterol degradation

Free sterols identified in suspended particulate matter samples are listed in Table IV-1 (as percent relative abundances and total sterol concentrations), along with particulate organic carbon (POC) concentration. Strong compositional differences were evident between samples. Samples from 5 and 20 m had high abundances of cholesta-5,24-dien-3 β -ol, 27-nor-24-methylcholesta-5,22*E*-dien-3 β -ol and 24-methylcholesta-5,22*E*-dien-3 β -ol, whereas the 40 m sample was enriched in 24-methylcholesta-5,22*E*-dien-3 β -ol. In contrast, deeper samples were dominated by cholest-5-en-3 β -ol and were relatively enriched in cholesta-5,22*E*-dien-3 β -ol. This sterol distribution suggests a mix of diatoms (although abundances of 24-methylcholesta-5,24(28)-dien-3 β -ol are low), and haptophytes (Volkman, 1986; 2003; Barrett *et al.*, 1995), and in the deeper samples, small (<53 μ m) zooplankton. Sampling for this investigation was carried out early in May following the regular diatom spring bloom. As diatom abundances decrease, the phytoplankton community at the MedFlux site typically shifts to higher contributions to smaller cells, especially cyanobacteria and prymnesiophytes (Marty *et al.*, 2002). Suspended particles in the mesopelagic zone (generally \geq 100 m depth) include labile phytodetrital material whose organic composition has been significantly altered relative to surface water particles (this study and e.g., Wakeham & Lee, 1989). Heterotrophic alteration by zooplankton and microbes has been the degradation processes most frequently discussed in the literature.

Total Δ^5 -sterol concentrations decreased rapidly with increasing depth (~100-fold over the water column sampled; Table IV-1), at a similar rate than POC (~100-fold). Due to the relative stability and diverse functional groups that may be attached to the tetracyclic carbon skeleton of Δ^5 -sterols, they may be useful for estimating relative effects of biotic and abiotic

(photooxidation and autoxidation) degradation in the marine environment (Christodoulou *et al.*, 2008).

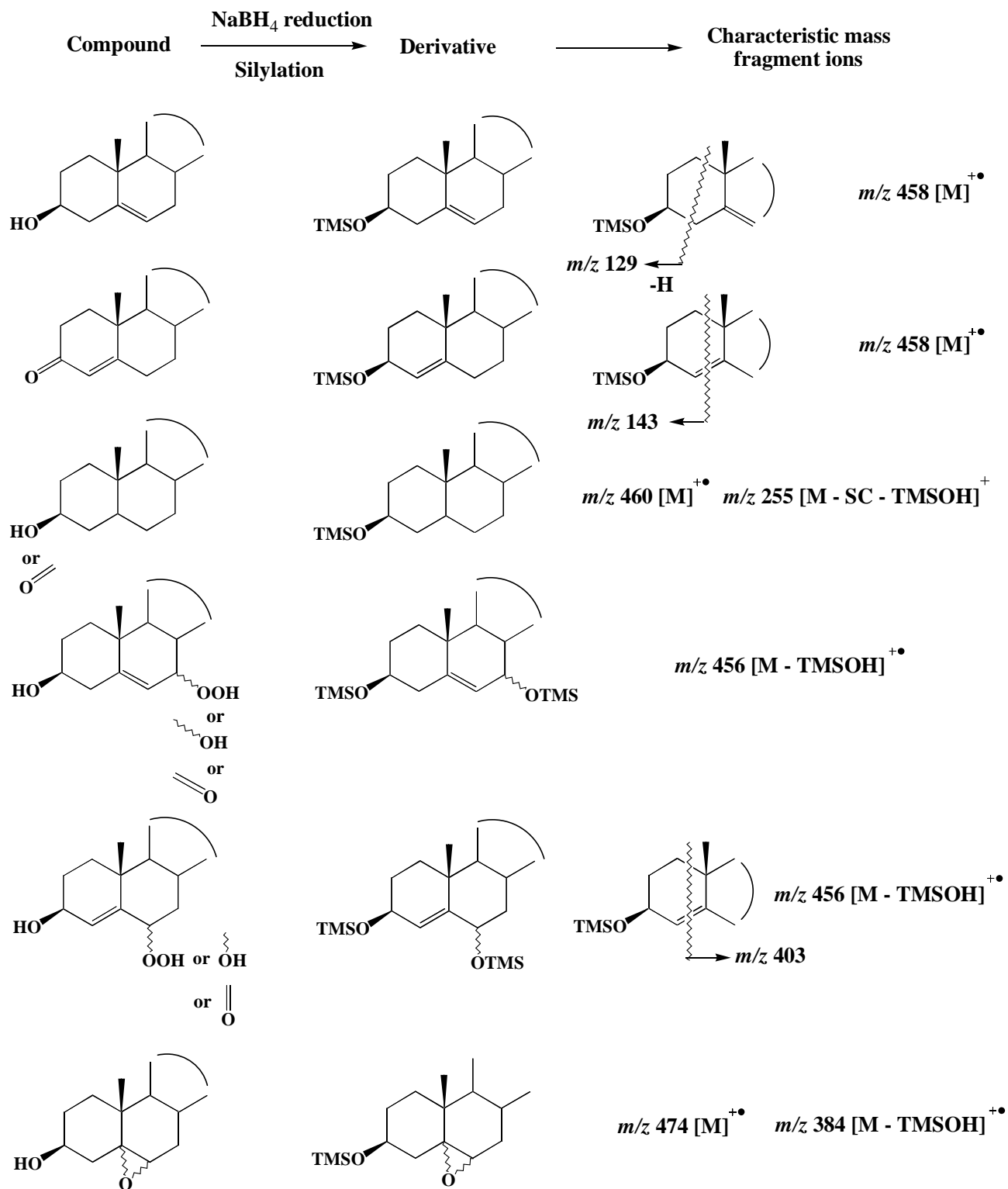


Fig. IV-1. Mass spectrometric characterization of sterols and their degradation products (the example given is cholesterol).

Table IV-1. Concentration of free Δ^5 -sterols and POC in the suspended particulate matter samples investigated.

	Depth (m)								
	5	20	40	80	100	125	150	400	800
24-Norcholesta-5,22E-dien-3 β -ol	4.1	4.2	5.8	2.8	2.5	5.8	2.0	2.5	-
27-Nor-24-methylcholesta-5,22E-dien-3-ol	18.1	17.8	9.9	10.0	11.7	8.5	8.7	7.2	4.5
Cholesta-5,22E-dien-3 β -ol	5.3	5.1	12.6	11.9	11.7	9.6	12.2	10.2	3.3
Cholest-5-en-3 β -ol	5.4	6.6	14.1	24.1	27.0	38.5	27.0	31.7	65.0
Cholesta-5,24-dien-3 β -ol	27.5	25.6	2.8	3.0	3.2	4.9	2.6	-	-
24-Methylcholesta-5,22E-dien-3 β -ol	17.8	17.8	31.9	15.9	16.3	11.1	13.3	14.6	11.6
24-Methylcholesta-5,24(28)-dien-3 β -ol	7.5	8.2	3.8	5.1	4.1	3.3	3.6	5.2	-
24-Methylcholest-5-en-3 β -ol	-	-	1.2	4.1	3.2	-	3.4	3.6	-
24-Ethylcholesta-5,22E-dien-3 β -ol	4.4	4.3	4.8	6.2	4.3	3.6	7.2	7.2	5.9
24-Ethylcholest-5-en-3 β -ol	3.1	3.7	7.2	8.8	8.7	11.5	11.6	12.7	9.7
24-Ethylcholesta-5,24(28)Z-dien-3 β -ol	2.9	2.6	2.0	2.8	2.5	3.1	3.1	5.1	-
24-n-propylcholesta-5,24(28)E-dien-3 β -ol	1.7	2.0	1.0	1.8	1.5	-	2.4	-	-
24-n-propylcholesta-5,24(28)Z-dien-3 β -ol	2.2	2.5	2.9	3.6	3.3	-	2.9	-	-
Total sterol concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$)	3.17	1.57	0.35	0.13	0.10	0.10	0.09	0.04	0.03
POC ($\mu\text{g l}^{-1}$)	126.3	103.5	16.6	9.3	4.8	5.9	4.0	4.0	1.2

Free radical oxidation (autoxidation) of Δ^5 -sterols yields mainly 7 α - and 7 β -hydroperoxides and, to a lesser extent, 5 α / β ,6 α / β -epoxysterols and 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxysterols (Smith, 1981; Fig. IV-2). Singlet-oxygen mediated photooxidation (type II photoreactions) produces mainly Δ^6 -5 α -hydroperoxides with low amounts of Δ^4 -6 α / β -hydroperoxides (Nickon & Bagli, 1961; Kulig & Smith, 1973) (Fig. IV-2). Δ^6 -5 α -hydroperoxysterols are unstable in seawater as they may undergo: (i) allylic rearrangement to Δ^5 -7-hydroperoxysterols (Smith, 1981; Rontani & Marchand, 2000) and (ii) homolytic cleavage resulting in ring opening (Christodoulou *et al.*, 2008). Characterization by GC/MS of Δ^6 -3,5-dihydroxysterols obtained by NaBH₄ reduction of the corresponding hydroperoxides presents some difficulties. Derivatization of these diols with pyridine/BSTFA results in the silylation of only the position 3 and the resulting monosilylated derivatives undergoes quantitative allylic rearrangement to Δ^5 -3,7-dihydroxysterols during GC analysis (Rontani & Marchand, 2000). Use of more powerful

silylating reagents such as TMSIM/BSA/TMCS (Bortolomeazzi *et al.*, 1999) or BSTFA/DMSO (Aubert, unpublished results) yield complete silylation of the diol, allowing GC/MS analyses without allylic rearrangement. However, derivatization with pyridine/BSTFA is preferred because it is difficult to eliminate DMSO or excess TMSIM/BSA/TMCS without losses of lipid material. Given these analytical and stability complications, Δ^5 -3 β ,7- and Δ^6 -3 β ,5- unsaturated diols are of little use in the present study.

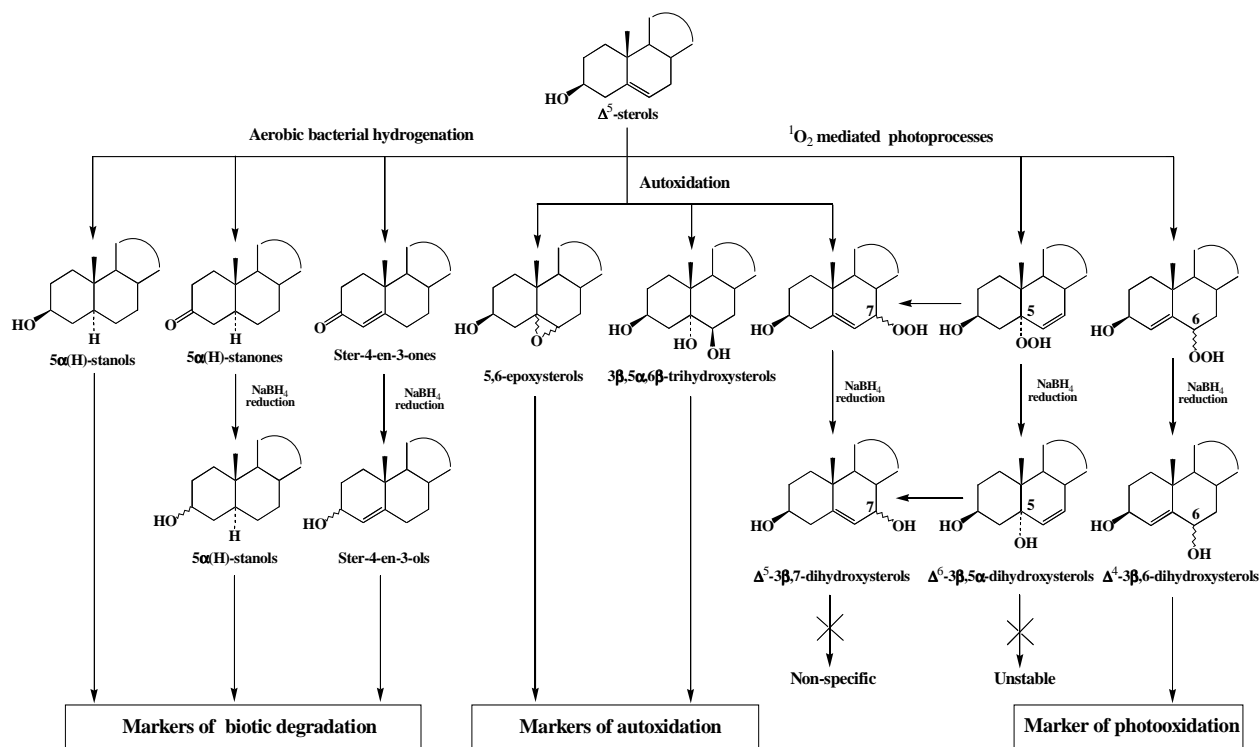


Fig. IV-2. Pathways of proposed tracers for biotic and abiotic degradation of Δ^5 -sterols.

We therefore selected 5 α / β ,6 α / β -epoxysterols and 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxysterols as tracers of free radical oxidation. As for photooxidation, we can use the Δ^4 -3,6-dihydroxysterols obtained by NaBH₄ reduction of Δ^4 -6-hydroperoxysterols (Fig. IV- 2) to estimate the extent of photooxidation in our samples. This estimation involves the ratios of Δ^4 -6-hydroperoxysterols/ Δ^6 -5-hydroperoxysterols previously measured in photooxidized senescent phytoplanktonic cells (0.34; Rontani *et al.*, 1997a) and in biological membranes (0.30; Korytowski *et al.*, 1992). Taking into account that:

$$\text{sterol photooxidation \%} = (\Delta^4\text{-}3\beta,6\alpha/\beta\text{-dihydroxysterol \%}) + (\Delta^6\text{-}3\beta,5\alpha\text{-dihydroxysterol \%}) \quad (\text{Eq. 1})$$

and that

$$\Delta^6\text{-}3\beta,5\alpha\text{-dihydroxysterol \%} = (\Delta^4\text{-}3\beta,6\alpha/\beta\text{-dihydroxysterol \%})/0.3 \quad (\text{Eq. 2})$$

we used the following equation:

$$\text{Sterol photooxidation \%} = (\Delta^4\text{-}3\beta,6\alpha/\beta\text{-dihydroxysterol \%}) * (1+1/0.3). \quad (\text{Eq. 3})$$

Aerobic bacterial degradation of Δ^5 -sterols may result to a complete mineralization of the molecule (Owen *et al.*, 1983; Naghibi *et al.*, 2002), probably through a series of intermediate ster-4-en-3-ones, $5\alpha(\text{H})$ -stanones and $5\alpha(\text{H})$ -stanols (Gagosian *et al.*, 1982a; de Leeuw & Baas, 1986; Wakeham, 1987; 1989) (Fig. IV- 2). NaBH_4 reduction of our samples that was carried out to reduce hydroperoxides arising from abiotic degradation converted ster-4-en-3-ones and $5\alpha(\text{H})$ -stanones to the corresponding alcohols. We thus selected ster-4-en-3-ols and $5\alpha(\text{H})$ -stanols as tracers of biotic degradation processes. It may be noted that $5\alpha(\text{H})$ -stanols and steroid ketones also are biosynthesized by some dinoflagellates (Robinson *et al.*, 1984; Volkman *et al.*, 1998), but we do not consider this to be a major source here since dinoflagellate-derived $4\alpha(\text{H}),23,24$ -trimethylcholest-22-en- 3β -ol was insignificant.

The use of the selected tracers to estimate the relative importance of the degradation processes on the parent Δ^5 -sterols requires that removal rates of the proposed tracers by further degradation are similar. For the purposes of this discussion we assume that the set of tracers exhibit similar reactivities towards bacterial mineralization processes. This assumption is based on the fact that aerobic bacterial mineralization of sterols generally involves initial degradation of the side chain, which is similar in all the tracers selected for each Δ^5 -sterol.

GC-EIMS analyses allowed the detection of significant amounts of ster-4-en-3-ols, $5\alpha(\text{H})$ -stanols, $5\alpha/\beta,6\alpha/\beta$ -epoxysterols, Δ^4 - $3\beta,6$ - and Δ^5 - $3\beta,7$ - epimeric unsaturated diols arising from the degradation of each Δ^5 -sterol in the different samples analyzed (Fig. IV-3). The estimated percentages of biotic and abiotic degradation (relative to the residual undegraded sterol) for cholest-5-en- 3β -ol and 24-ethylcholest-5-en- 3β -ol are shown in figure IV-4. These two sterols were selected since: (i) they were present at significant levels in all the samples investigated (Table IV-1), and (ii) the characterization of their autoxidation products is easier than in the case of diunsaturated sterols (for which there is additional autoxidation of the side-chain). Figure 4 clearly indicates that products of abiotic degradation predominate over products of biotic degradation of suspended organic matter in the NW Mediterranean, not just in the sunlit surface waters but significantly even in the deeper aphotic mesopelagic zone. Furthermore, the extent of abiotic degradation varied down the water column. Not surprisingly, particles collected at 20 and 40 m corresponding to the chlorophyll maximum (centred at 28 m)

appeared to the least degraded, either biotically or abiotically, consistent with healthy cells in good physiological state. We can not adequately explain weakly degraded material at 150 m, and can not know whether this observation is temporally significant. Also not surprisingly, photodegradation appeared to be significant at 5 m. If we extrapolate to other organic components of the particle pool, we would speculate that there would be intense photobleaching of pigments at 5 m. The elevated abundances of stanols in surface sediments we analysed are indicative of biotic degradation of sterols following deposition. On the other hand, lower abundances of stanols in the deep particulate samples analyzed suggest that the deep particles contain relatively little resuspended sedimentary organic matter.

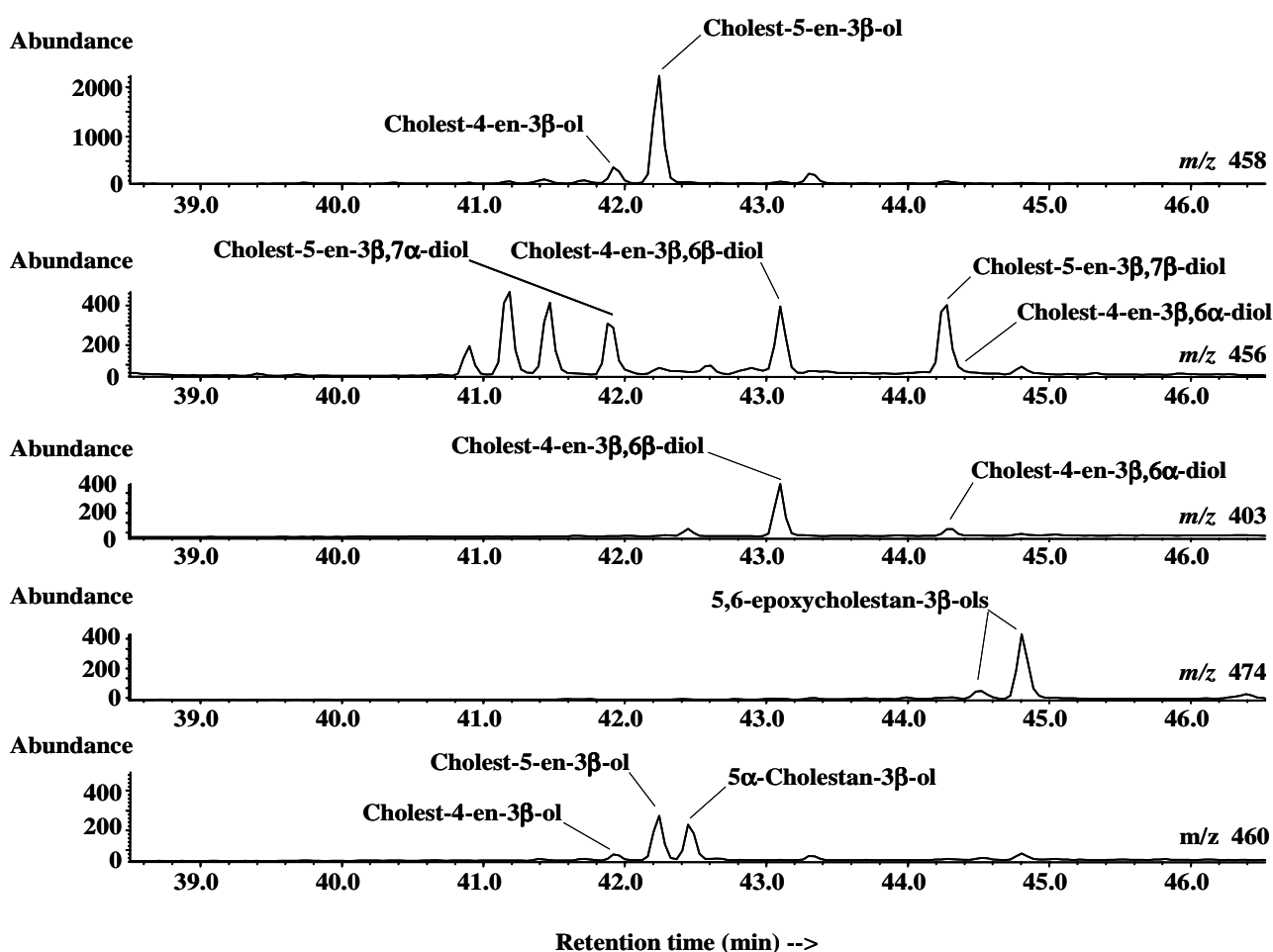


Fig. IV-3. Partial m/z 458, 456, 403, 474, 460 mass fragmentograms of total lipid extracts showing the presence of cholesterol degradation products in suspended particulate matter collected at 100 m.

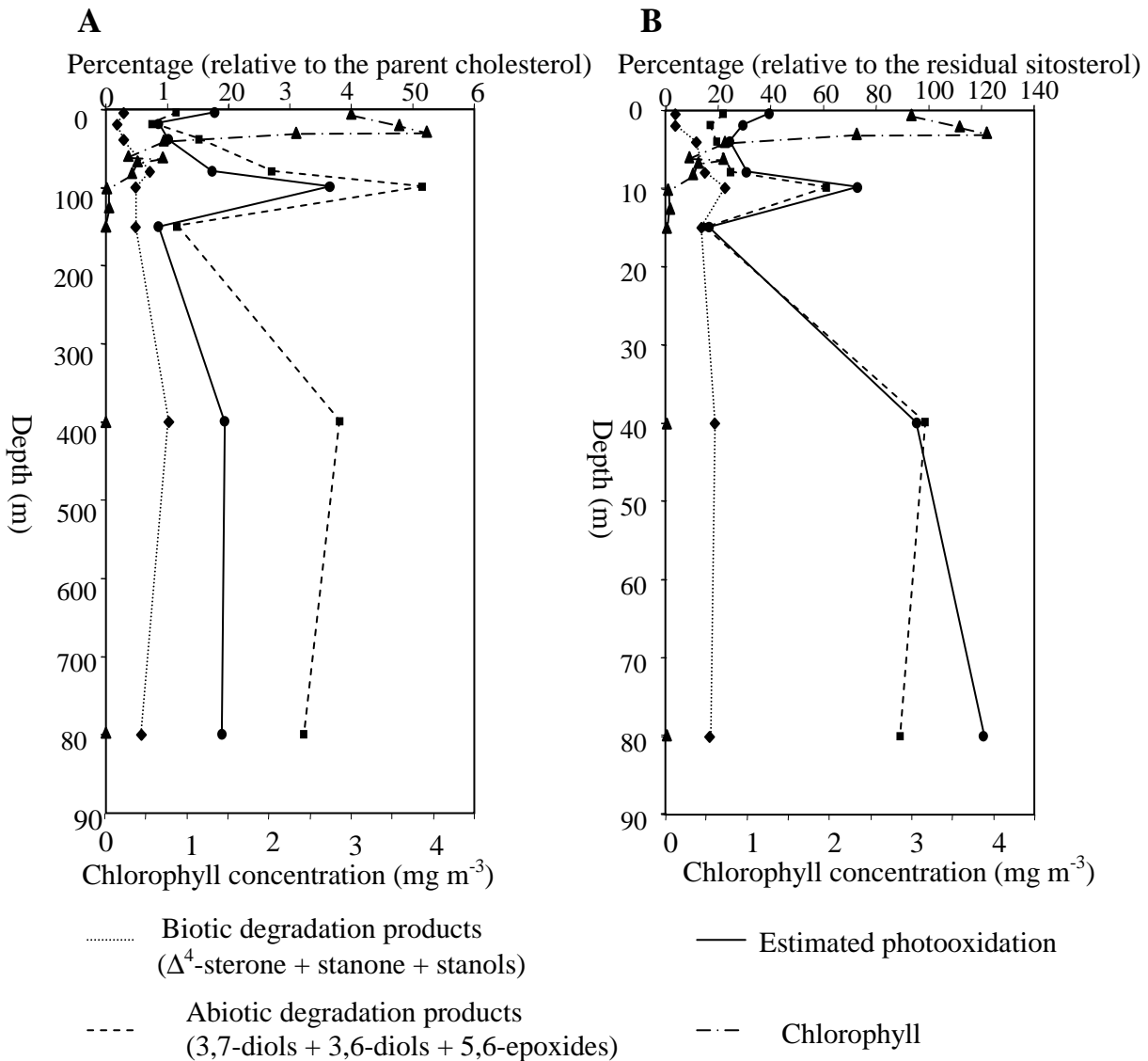


Fig. IV-4. Chlorophyll concentration and percentages of biotic and abiotic degradation products for cholest-5-en-3 β -ol (A) and 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol (B) in the samples investigated. (Abiotic degradation products include photo- and autoxidation products).

The observation of significant abiotic degradation for the abundant slowly sinking suspended particles that dominate the standing stock of POC (McCave, 1984; Wakeham, 1989) contrasts with previous conclusions that the rare, rapidly sinking particles that dominate the vertical flux of POC but are collected in sediment traps (or on the 53 μm screens used here) were more affected by biotic degradation than by abiotic degradation (Christodoulou *et al.*, 2008). Steroidal ketones formed via bacterial degradation of sterols were a significant part of the lipids in the sinking particles in the Pacific Ocean, but not in suspended particles (Wakeham, 1987; Wakeham & Lee, 1989). The most straight-forward explanation for these differences is

that slowly sinking suspended particles spend much more time in the photic layer where photooxidation can occur. Eventually, even the suspended particles sink, albeit slowly, during which time they are subject to further non-photolytic abiotic degradation and/or particles at depth simply reflect processes that occurred in surface waters sometime in the past.

The present results also contrast with analyses of suspended particles from the Black Sea (Rontani & Wakeham, 2008). In that case, biotic degradation appeared to be much more important (70% of the residual sterol) than abiotic degradation (5% of the residual sterol). There are, however, important differences between the NW Mediterranean and the Black Sea that would impact the relative importance of abiotic vs biotic degradation. Although the entire water column of the Mediterranean site is oxygenated (~6 ml/l O₂ in the mixed layer to 25 m depth, ~4 ml/l from 100 – 800 m) which might support aerobic microbial degradation, bacterial cell numbers decrease significantly with depth (25 x 10⁴ cells/ ml at 20 m, 45 x 10⁴ cells/ ml at 60 m, 2 x 10⁴ cells/ ml at 1000 m; Tamburini *et al.*, 2008). This would imply significant microbial degradation “potential”, recognizing that cell numbers do not readily extrapolate to microbial decomposition rates. On the other hand, the Black Sea is anoxic below ~100 m, but cell numbers change to a lesser degree between the oxic surface waters (22 x 10⁴ cells/ ml at 10 m), the intermediate suboxic zone (27 x 10⁴ cells/ ml at 20 m), and the deep anoxic zone (10 x 10⁴ cells/ ml at 800 m). In fact, it is because of the intense microbial activity that the suboxic and anoxic zones are sustained, so that a higher proportion of biotic degradation in the Black Sea is logical.

Comparison of apparent degradation states of cholest-5-en-3 β -ol and 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol suggests that 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol might be more affected by abiotic degradation than cholest-5-en-3 β -ol., even in surface waters, with relatively little difference for biotic degradation (Fig. IV- 4). It is intriguing to speculate that this difference might result from the origins and transport mechanisms for the two sterols. 24-Ethylcholest-5-en-3 β -ol is present in some marine algae, as is cholest-5-en-3 β -ol (Volkman, 1986, 2003), but a vascular plant origin may dominate in areas influenced by terrigenous sources. Indeed, terrestrial inputs resulting from eolian transport of dust from Africa are frequent in northwestern Mediterranean Sea (e.g. Migon *et al.*, 2002; Guieu *et al.*, 2002; Bartoli *et al.*, 2005) and were common features during the MedFlux program (Lee *et al.*, 2009 a,b). Atmospheric inputs could thus constitute a potential allochthonous source of “predegraded” material to the NW Mediterranean. Cholest-5-en-3 β -ol, on the other hand, is likely derived primarily from

autochthonous (marine) sources. It is interesting to note that the presence of an additional double bond in the side-chain of Δ^5 sterols does not induce systematically higher degradation rates.

3.2. Alkenone degradation in the NW Mediterranean

Results discussed above show that both biotic and abiotic degradation can have a significant affect on sterol compositions and by inference other components of the particulate organic matter pool. Biotic and abiotic degradation can also affect alkenones (Rontani *et al.*, 2006b; 2008). Treatment of the lipid extracts in this study (NaBH_4 reduction carried out to reduce photochemically or autoxidatively-produced hydroperoxides and subsequent derivatisation), reduced alkenones to alkenols which were then silylated. The silylated alkenols thus formed display better chromatographic characteristics than the corresponding alkenones and have diagnostic EI mass spectra, (strong fragment ions at m/z 117 and 131 due to cleavage α to the functional group, allowing methyl and ethyl alkenols (and hence the parent alkenones) to be readily differentiated by selected ion monitoring (SIM), even at low abundances (Rontani *et al.*, 2001). For our particle samples here, C_{36} - C_{39} alkenols (and hence the parent alkenones) are readily detected (Fig. IV-5).

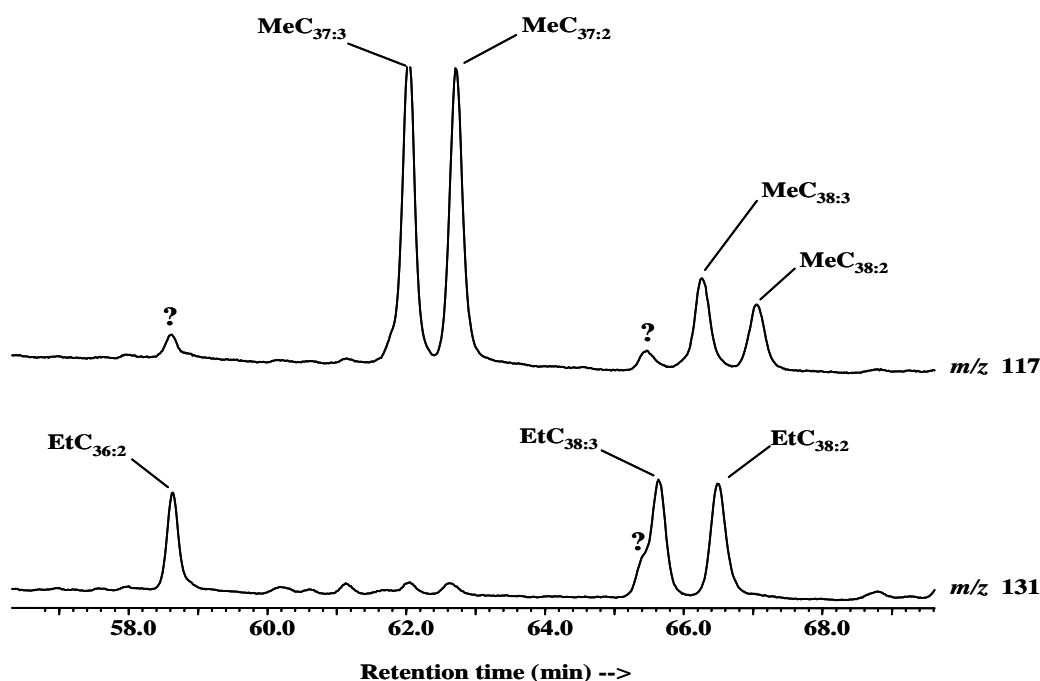


Fig. IV-5. Partial m/z 117 and 131 mass fragmentograms of silylated NaBH_4 -reduced total lipid extracts showing the presence of alkenols in suspended particulate matter collected at 5 m.

The diunsaturated C₃₆ alkenone exhibiting an unusual double bond spacing of three methylene groups instead of five (Fig. IV- 6) has also been reported in DYFAMED sediment trap samples (Rontani *et al.*, 2001), and particulate matter and sediments from the Black Sea (Xu *et al.*, 2001; Rontani & Wakeham, 2008).

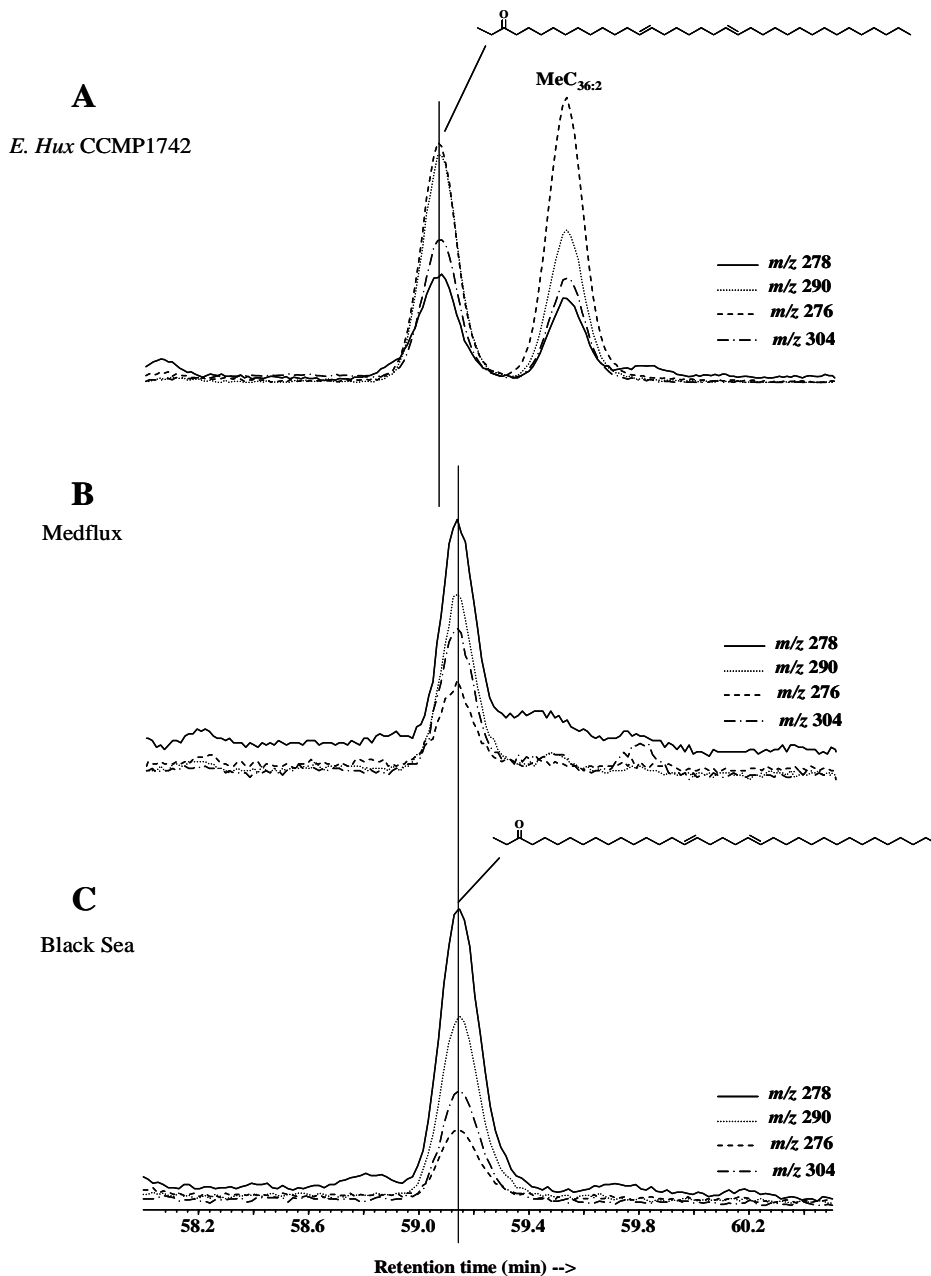


Fig. IV-6. Partial m/z 276, 278, 290, 304 mass fragmentograms of 3-hydroxyhexatriaconta-14,21-diene (obtained after NaBH₄ reduction of the alkenone fraction of the *E. huxleyi* strain CCMP 1742 now producing strong proportion of shorter alkenones; Prahl *et al.*, 2006b) (A), 3-hydroxyhexatriaconta-16,21-diene (obtained after NaBH₄ reduction of the alcénone fraction of Unit II Black Sea sediments) (B) and silylated NaBH₄-reduced EtC_{36:2} alkenone present in the sample collected at 5 m (C).

The shape of the alkenone concentration profile is similar to that of Δ^5 -sterols (Table IV-2); alkenone concentrations decrease much more rapidly (~500 fold) than sterols (~100-fold) or POC (~100-fold). This might be related to the fact that the haptophyte source of alkenones is restricted to surface waters, or that alkenones are very labile. Previous studies (Prahl *et al.*, 2000a; Wakeham *et al.*, 2002) have shown that only a small fraction of alkenones present in the upper water column reaches the underlying sediments, yet the unsaturation index remains relatively unchanged, a requirement from a palaeothermometer perspective. There is, however, evidence that selective degradation might affect alkenone unsaturation and the resulting $U_{37}^{K'}$ (Freeman & Wakeham, 1992; Hoefs *et al.*, 1998; Gong & Hollander, 1999; Rontani & Wakeham, 2008). For our samples, $U_{37}^{K'}$ values increase significantly (from 0.43 to 0.55) with increasing water depth (Table IV-2).

Table IV-2. Alkenone concentration and unsaturation ratio in the suspended particulate matter samples investigated.

Depth (m)	Σalk^a (ng l ⁻¹)	MeC ₃₇ ^b (%)	MeC ₃₈ ^b (%)	EtC _{36:2} ^b (%)	EtC ₃₈ ^b (%)	$U_{37}^{K'}$	Estimated temperature ^f
5	28.8	51.8	19.6	7.0	21.6	0.43	15.6
20	13.3	55.0	16.5	6.3	22.2	0.43	15.6
40	1.3	54.4	14.5	4.0	27.1	0.43	15.6
80	1.8	56.7	18.3	0.5	24.5	0.45	16.1
100	1.0	52.6	17.5	0.9	28.8	0.49	17.1
125	0.4	57.9	18.1	0.8	23.2	0.46	16.3
150	0.5	55.3	17.0	2.1	25.6	0.45	16.1
400	0.1	64.7	16.7	tr ^c	18.6	0.54	18.3
800	0.06	71.7	13.9	tr	15.9	0.55	18.5
(ng g ⁻¹ dry weight)							
Sediment (0-0.5 cm)	8.8	65.7	8.0	tr	26.3	0.61 ^d 0.56 ^e	20 ^d 18.7 ^e

^a Total alkenone concentration.

^b Concentration of C₃₇ methyl, C₃₈ methyl, C_{36:2} ethyl and C₃₈ ethyl ketones as a percentage of total alkenone concentration, respectively.

^c Trace amounts (< 0.1%).

^d Without correction of stereomutation

^e With correction of stereomutation

^f Based on the Ternois *et al.* (1997) equation

Selective degradation of the 37:3 alkenone compared to the 37:2 alkenone would cause the $U_{37}^{K'}$ to increase. On the basis of the results obtained above for Δ^5 -sterols, this increase might be attributed to a selective autoxidative degradation of alkenones (Rontani *et al.*, 2006b,

2007). In order to check on the relevance of this process for our NW Mediterranean particles, we plotted variations of $U_{37}^{K'}$ index against percentages of sterol tracers of autoxidation ($5\alpha/\beta,6\alpha/\beta$ -epoxycholestan- 3β -ol and $5\alpha/\beta,6\alpha/\beta$ -epoxy-24-ethylcholestan- 3β -ol; Fig. IV-7).

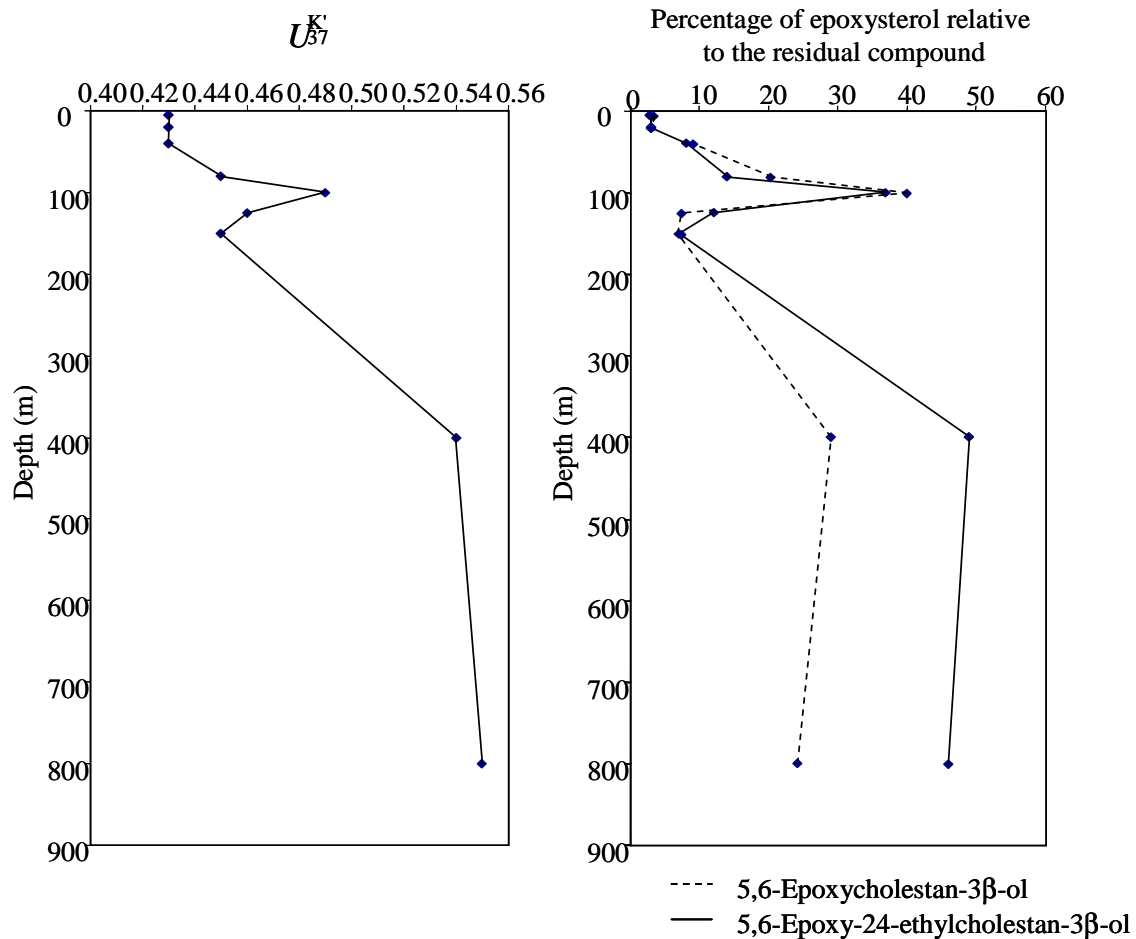


Fig. IV-7. $U_{37}^{K'}$ index and percentages of 5,6-epoxycholestan- 3β -ol and 5,6-epoxy-24-ethylcholestan- 3β -ol measured in the samples investigated.

Although comparison of the $U_{37}^{K'}$ values at deeper and shallower depths is difficult, since these samples represent well distinct time integration of temperature signal, the correspondence observed between the profiles well supports our suggestion. Thus, in the NW Mediterranean, autoxidation of alkenones associated with suspended particles can yield a non-trivial increase in $U_{37}^{K'}$ values with increasing depth in the water column, which could translate into a $+3.2^{\circ}\text{C}$ change in the inferred temperature when interpreted using the Ternois *et al.* (1997) $U_{37}^{K'}$ -temperature calibration equation ($U_{37}^{K'} = 0.041T - 0.21$) that is appropriate to the NW Mediterranean. It must be stressed that the suspended particle pool sinks only

slowly through the water column and may be uncoupled from the fast sinking particles that constitute most of the flux to sediments (Wakeham & Lee, 1989), and thus contribute to the sediment temperature record. Autoxidative alteration of $U_{37}^{K'}$ has been observed for sinking particulate matter collected during DYFAMED sediment trap deployments (Rontani *et al.*, 2006b; Christodoulou *et al.*, 2008).

Aerobic microbial degradation also has the potential to alter $U_{37}^{K'}$ values and thus introduce further uncertainty in the paleotemperature reconstruction, particularly for oxic sediments environments (Rontani *et al.*, 2008). Bacterial epoxidation of alkenone double bonds produces epoxyketones that are easy to detect after NaBH_4 reduction to the corresponding diols and subsequent silylation and thus might be used as potential indicators of *in situ* aerobic bacterial alteration of the alkenone unsaturation ratio. We did not find any epoxyketones in the present particle samples. Thus in the absence of measurable biotic degradation, autoxidation must predominate.

Double bonds of alkenones can be stereomutated by thiyl radical-dependent mechanisms (Rontani *et al.*, 2006a), with differences in reactivity of the $\text{C}_{37:2}$ and $\text{C}_{37:3}$ alkenones affecting $U_{37}^{K'}$. The $U_{37}^{K'}$ value measured in the surface sediment (0-0.5 cm) we analysed was 0.61 (Table IV-2), agreeing with values of 0.54 to 0.65 reported by Ternois *et al.* (1996) for other NW Mediterranean surface sediments. Careful GC-EIMS examination of trimethylsilylated alkenol peaks for the sediment sample (Fig. IV- 8) allowed us to detect stereomutated compounds (i.e. with *cis* double bonds). Changes in measured $U_{37}^{K'}$ values might result from co-elution problems as well as from differential rates of stereomutation of $\text{C}_{37:2}$ and $\text{C}_{37:3}$ alkenones. Using a relationship between $U_{37}^{K'}$ and the percentage of stereomutated $\text{MeC}_{37:2}$ alkenone that we developed during a study in the Black Sea (Rontani & Wakeham, 2008), we estimate that the increase in $U_{37}^{K'}$ index resulting from stereomutation recorded in our surface sediment would be +0.05 (equal to a +1.3°C change in the inferred temperature). Perhaps coincidentally, the corrected $U_{37}^{K'}$ index value thus obtained (0.56) is very close to the measured values in suspended particulate matter samples collected at 400 and 800 m (0.54 and 0.55, respectively; Table IV-2), but markedly different from surface values (0.43).

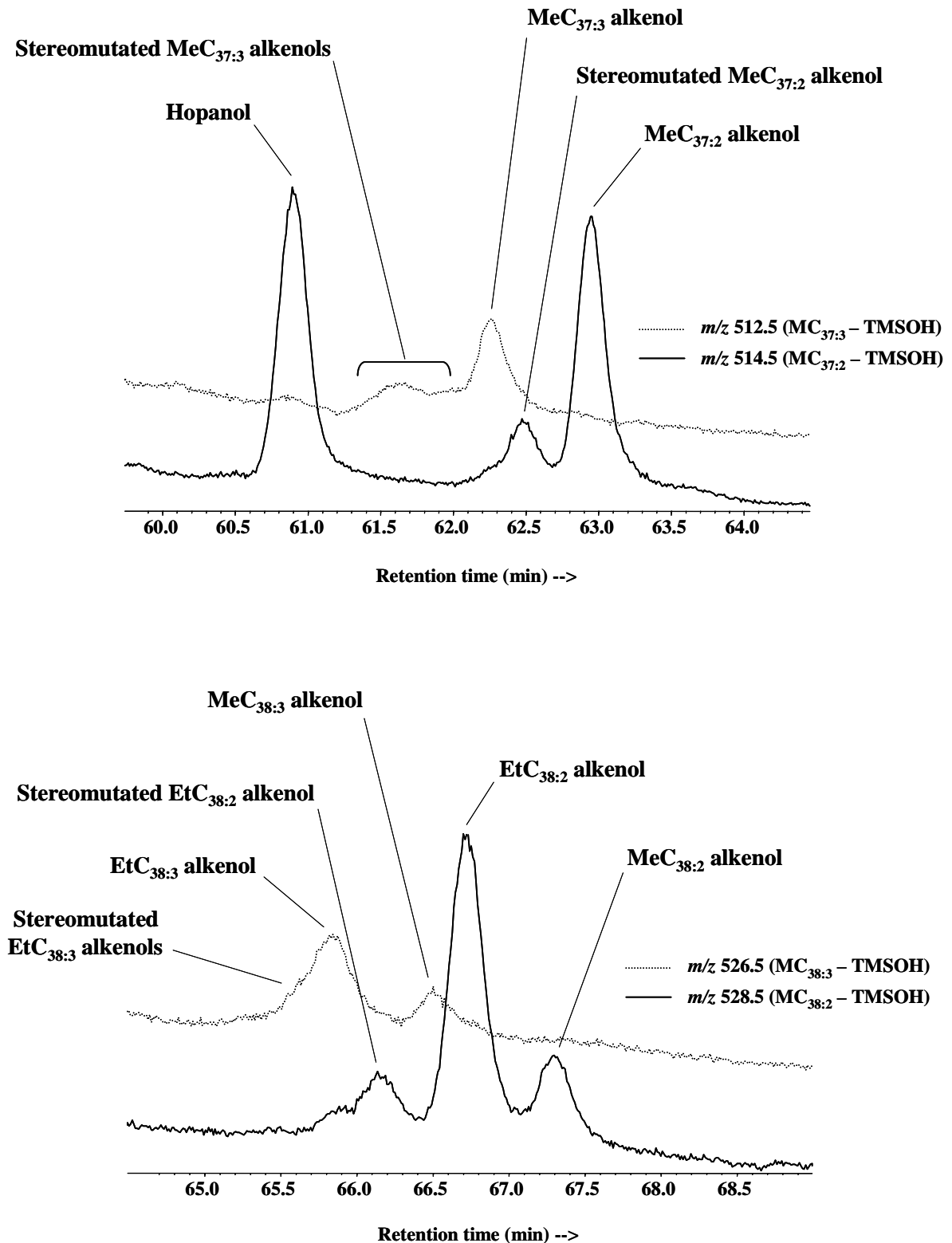


Fig. IV- 8. Partial m/z 512.5, 514.5, 526.5, 528.5 mass fragmentograms showing the presence of stereomutated silylated alkenols in the top layer (0–0.5 cm) of sediments.

4. Conclusions

The degradation of Δ^5 -sterols and alkenones was studied in suspended particulate matter and sediment samples collected in northwestern Mediterranean Sea. Total Δ^5 -sterol and alkenone concentrations strongly decrease with increasing depth, suggesting significant degradation in the water column. The relative stability and diverse functional groups of the steroidal tetracycle are useful for estimating the relative effects of biotic (bacterial hydrogenation) and abiotic (photooxidation and autoxidation) degradation processes. We propose that $5\alpha/\beta,6\alpha/\beta$ -epoxysterols and $3\beta,5\alpha,6\beta$ -trihydroxysterols are good tracers of estimating the relative importance of free radical (auto)oxidation, Δ^4 -3,6-dihydroxysterols obtained by NaBH_4 reduction of Δ^4 -6-hydroperoxysterols are useful for photooxidation, and ster-4-en-3-ols and $5\alpha(\text{H})$ -stanols can be used for biotic degradation. The results obtained showed that abiotic degradation strongly predominates in suspended particles in the NW Mediterranean.

C_{36} - C_{39} alkenones (measured as alkenols obtained by NaBH_4 reduction of parent alkenones) in water column particle and sediment samples investigated yielded $U_{37}^{K'}$ indices that increase significantly (from 0.43 to 0.55) with increasing water depth. Biotic degradation of alkenones appeared unimportant in this water column environment. However, a good correlation between variations of $U_{37}^{K'}$ index and concentrations of Δ^5 -sterol autoxidation products supports autoxidation of alkenones as a key degradative process. We also detected stereomutated alkenones (with *cis* double bonds) in the surface sediment and estimate that stereomutation increases $U_{37}^{K'}$ index in this sediment by +0.05. Degradation of alkenones in the marine water column may therefore have a significant effect on paleotemperature reconstructions.

Acknowledgements

MedFlux was supported by the U.S. National Science Foundation Chemical Oceanography Program (grant OCE-0113687 to SGW). We thank MedFlux collaborators C. Lee, R. Armstrong, J.K. Cochran, J.C. Miquel, S. Fowler, M. Goutx, C. Tamburini and M.L. Peterson for making MedFlux a vital and productive program. Juan Carlos Miquel (IAEA, Monaco) and J. K. Cochran (Stony Brook U) provided the particle samples and POC concentrations; L. Abramson assisted with sediment sampling; C.M. Wakeham helped with sample preparation.

We thank the Captain and crew of R/V Tethys II for a very successful cruise and the International Atomic Energy Agency in Monaco for logistical assistance during MedFlux. S.G.W. thanks the Hanse-Wissenschaftskolleg/Institute for Advanced Study in Delmenhorst, Germany, for a Fellowship that supported the preparation of this paper. This work was also supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de la Méditerranée. Two anonymous reviewers are gratefully acknowledged for their useful and constructive comments. This is MedFlux contribution No. 29.

CHAPITRE V

**Validité des températures mesurées à partir du
paléothermomètre $U_{37}^{K'}$ à la surface des sédiments
dans les hautes latitudes et autres zones
océanographiques**

AVANT-PROPOS

Suite aux travaux effectués en mer Méditerranée, nous nous sommes intéressés au devenir des alcénones dans un environnement marin de haute latitude, l'Alaska.

Ce chapitre présente les résultats obtenus lors de l'analyse de la composition en alcénones de 27 échantillons de sédiments de surface de divers sites du sud-est de l'Alaska (55°N-61°N). Les concentrations en alcénones se sont révélées plus importantes à la surface du sédiment du sud de Icy Strait (~58°N) avec une dominance des alcénones en C₃₇ di- et tri-insaturées.

Les températures estimées à partir des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ se sont avérées varier de 10,4°C à 13,9°C soit une valeur moyenne de 11,8°C ±1°C, sans distinction apparente entre les sites nord et sud de Icy Strait. Ces températures sont significativement plus chaudes (+4°C) que la température moyenne annuelle des eaux de surface (maSST) de cette région, impliquant la mise en œuvre de facteurs ayant entraîné un biais significatif dans l'estimation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$.

La détection d'époxyalcénones dans tous les échantillons contenant des alcénones a permis en effet de démontrer qu'une dégradation bactérienne significative des alcénones s'était produite lors de la diagenèse de ces composés. La proportion relative des époxyalcénones par rapport aux alcénones parentes en C_{37:2} et C_{37:3} variait de ~ 1 à 4% et de 1 à 7%, respectivement. Ces résultats ont permis de mettre en évidence une plus grande altération de l'alcénone en C_{37:3}, ayant pour conséquence l'augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$.

Durant cette étude, une méthode empirique permettant de quantifier le biais résultant d'une dégradation bactérienne sélective des alcénones a été proposée. Pour cela, nous avons utilisé des données obtenues lors d'expérimentations *in vitro* visant à étudier la dégradation bactérienne d'alcénones contenues dans des débris cellulaires d'*Emiliania huxleyi*. A partir de ces données, nous avons établi une équation quadratique permettant d'estimer les augmentations des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dues à la dégradation bactérienne sélective en fonction du taux d'insaturation des époxyalcénones formées lors de cette dégradation ($EpU_{37}^{K'} = [EpC_{37:2}] / ([EpC_{37:2}] + [EpC_{37:3}])$). Nous avons ainsi pu estimer que l'augmentation de température résultant d'une dégradation bactérienne sélective des alcénones dans les échantillons sédimentaires de l'Alaska, variait de +0,7 à +2,4°C selon les sites (valeur moyenne = +1,4°C).

Toutefois, après correction de ce biais les températures estimées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ étaient toujours significativement plus hautes que les maSSTs et correspondaient davantage aux températures estivales du sud-est de l'Alaska. Ceci a été attribué à la prédominance d'un apport estival des alcénones. En effet, il est très probable qu'en raison des conditions climatiques et environnementales particulières des zones de hautes latitudes, la multiplication des haptophytes soit privilégiée en été. Afin de confirmer cette hypothèse, la signature en alcénones de sédiments provenant du nord de l'Atlantique et de la côte sud du Chili ($\sim 45^\circ\text{S}$) a été re-examinée. Cette comparaison a permis de mettre en évidence des déviations des températures estimées à partir de l' $U_{37}^{K'}$ similaires dans ces trois régions du monde. L'augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dans ces différents environnements pourrait donc s'expliquer par un biais saisonnier résultant d'un apport plus important d'alcénones en période estivale.

L'analyse d'échantillons sédimentaires collectés dans trois régions océanographiques de plus basses latitudes (Golfe de Californie, Zone d'upwelling du Pérou et nord-est du Pacifique ($\sim 40^\circ\text{N}$)) ont conduit à la mise en évidence d'autres déviations des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ par rapport aux maSSTs et diverses explications ont été proposées.

Systematic pattern in $U_{37}^{K'}$ – Temperature residuals for surface sediments from high latitude and other oceanographic settings

Prahl, F.G., Rontani, J-F., Zabeti, N., Walinsky, S.E., Sparrow, M.A.

Geochimica et Cosmochimica Acta (2010), **74**: 131-143

ABSTRACT

Twenty-seven multicores, collected in late summer 2004 from coastal and inland marine sites throughout SE Alaska (~55 to 61°N), were analyzed for C₃₇ to C₃₉ alkenones of specific haptophyte origin. This biomarker signal, detected in core-top sediments from 20 of the sites, was quantitatively most significant in organic carbon and biogenic silica-rich sediments deposited south of Icy Strait (~58°N), along the outer coastline of Baranof and Prince of Wales islands. $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimates derived using a standard calibration equation ($U_{37}^{K'} = 0.034T + 0.039$) were uniform throughout the study area, averaging 11.9 ± 1.0 °C, a value ~ 4 °C warmer than mean annual SST (maSST) for the region. Epoxides, indicative of selective alkenone degradation by an aerobic bacterial process, were also detected and quantified in all sediments containing alkenones. Semi-quantitative accounting of the impact that compound-selective degradation can impose on alkenone unsaturation patterns indicates the standard $U_{37}^{K'}$ -based temperature estimates could be too warm by a variable amount (0.7–2.4 °C) depending upon the site, with an overall average of ~1.4°C. Even after adjustment for this potential diagenetic "warming" effect, estimates still best match summer and not maSST in this subarctic region. Re-examination of alkenone signatures preserved in sediment from the North Atlantic and on the continental margin located south of ~45°S along the Chilean coast indicates the apparent summer signal in $U_{37}^{K'}$ -derived SST estimates is not unique to SE Alaskan sediments but rather a common finding when alkenone thermometry is applied to sediments from high latitude environments. Examination of model residuals from analysis of surface sediment samples

collected at lower latitude settings along the west coast of the Americas also identifies other sites where significant biogeographic patterns seem apparent and viable oceanographic explanations can be offered.

Keywords: Gulf of Alaska, alkenones, sea-surface temperature, paleothermometry

1. INTRODUCTION

Alkenone thermometry (Brassell *et al.*, 1986)** is now a well-established tool for paleoceanographic study (Herbert, 2003). A remarkably linear relationship with mean annual sea surface temperature (maSST) describes the variability of alkenone unsaturation patterns ($U_{37}^{K'}$) measured in modern sediments depositing from 60°N to 60°S throughout the Atlantic, Indian and Pacific Oceans. The error in mast estimates derived from this global core-top calibration ($U_{37}^{K'} = 0.033 \times \text{maSST} + 0.044$, $r^2 = 0.958$; Müller *et al.*, 1998) is small ($\pm 1.4^\circ\text{C}$, Herbert, 2003), making use of stratigraphic down core $U_{37}^{K'}$ measurements, paired with other environmental proxies, very attractive for insightful paleoceanographic and paleoclimatic reconstruction purposes (e.g., Herbert *et al.*, 2001; Lamy *et al.*, 2003; Martrat *et al.*, 2007).

However, the strong statistical relationship between a $U_{37}^{K'}$ measurement and maSST at a given sampling location is not founded on a rigorous mechanistic relationship between biomarker synthesis and mean-annual surface ocean temperatures. Hence, the accuracy of the absolute maSST estimate is not always assured. Like all phytoplankton, alkenone-producing haptophytes are not equally productive year round. Furthermore, "export" production from surface waters, the factor setting the paleorecord for these biomarkers in sediments, is also more often than not seasonally skewed (e.g., Prahl *et al.*, 2000b; Sikes *et al.*, 2005; Harada *et al.*, 2006 and references therein). Given the oceans are not uniform biogeographically, the degree of seasonal skewing of the sedimentary alkenone record almost certainly differs throughout the modern ocean and, because of climatically controlled oceanographic change, likely through time at specific locations

** Les références bibliographiques ont été centralisées à la fin du manuscrit

(e.g., Haug *et al.*, 2005). Furthermore, as for all organic matter, alkenones exported to the seabed are quite sensitive to degradation and not preserved everywhere with the same efficiency (Prah *et al.*, 2001). Although the exact control on their preservation remains questionable, considerable evidence suggests oxygen availability at or within the seabed is one key factor (Hoefs *et al.*, 1998; Gong & Hollander, 1999). Samples in the global core-top calibration represent depositional environments spanning a wide range of oxygen availability. Given recent experimental findings that aerobic degradation of alkenones can occur with significant compound selectivity under certain biogeochemical circumstances (e.g., Rontani *et al.*, 2008), the impact of variable preservation efficiency on $U_{37}^{K'}$ values recorded in sediments is a paleoceanographic concern warranting further, careful consideration.

While the error of maSST estimation for a given $U_{37}^{K'}$ measurement is remarkably small, a $\pm 1.4^{\circ}\text{C}$ uncertainty (1σ) is still considerable and could disguise climatically significant variation in water temperature for a given environment. We now report results from compositional analysis of alkenones in core-top samples collected throughout coastal and inland waters of SE Alaska. These results are discussed in broad context with a question fundamental to alkenone thermometry that has been asked throughout the evolution of this paleoceanographic research field (Herbert, 2003). Do significant, systematic, biogeographic patterns of variation in the global core-top $U_{37}^{K'}$ versus maSST calibration exist that reflect such environmental factors as redox dependent, compound selective degradation (e.g., Hoefs *et al.*, 1998; Gong & Hollander, 1999), seasonal production and export (e.g., Sikes *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 2006) and non-thermal physiological stress impacts on biosynthetic pathways (e.g., Prah *et al.*, 2006a)?

2. Material and methods

2.1. Description of study area

The region sampled by multicorer between 55°N and 61°N in the NE Gulf of Alaska spans a large range of oceanographic settings, including coastal and inland waters (Fig. V-1). Icy Strait

(~58°N) divides the region into two distinct sedimentary zones (Walinsky *et al.*, 2009). The zone to the north receives a more significant input of detrital materials from rivers draining extensively glaciated, highly mountainous landscape with limited vegetation. The zone to the south is punctuated by large islands adjacent to heavily forested slopes with relatively few glaciers (Milliman & Syvitski, 1992). Overall, our study region is characterized by downwelling conditions owing to the cyclonic circulation of the prominent Alaskan Current (Fig. V-1). Nonetheless, elevated primary production is prevalent seasonally in specific parts of the study region. Composite SeaWiFs satellite imagery, averaged over five summer periods (June 15–August 30, 1998–2002), indicates chlorophyll concentration is significantly greater in surface waters south of Icy Strait, particularly in proximity to inland waters of Baranof and Prince of Wales islands (Stabeno *et al.*, 2004).

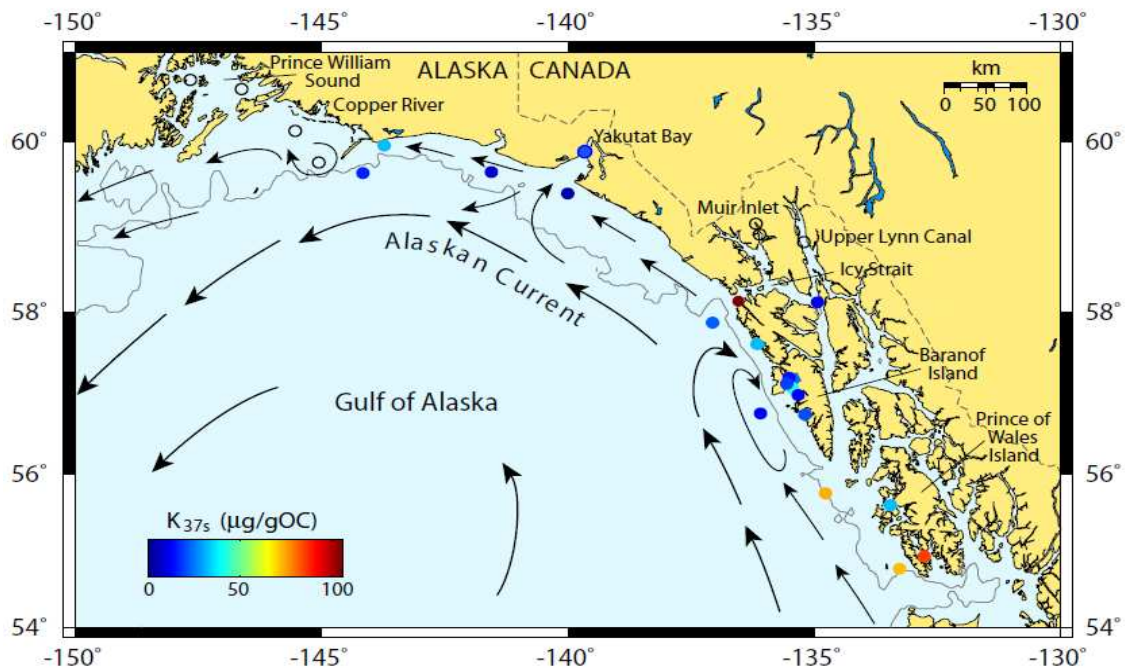


Fig. V-1. Map showing the location of the 27 sites in SE Alaskan study region where surface sediments were obtained by multicorer. Colored circles represent 20 sites where alkenones were detected and quantified. The color of each circle indicates the total organic carbon-normalized concentration of C_{37} alkenones (K_{37s}) measured at each of these sites (see colorbar for scale). Unfilled circles identify the 7 core sites where alkenones were below detection. The offshore region of the map is annotated with a grey line, indicating the 200 m isobath, and arrows, showing the overall regional pattern of physical oceanographic circulation (adapted from figure in Reed and Schumacher, 1987).

Multicores collected west of 140°W included 6 from settings on the open continental shelf and slope and 2 within Prince William Sound. Those collected east of this meridian included 5 from similar coastal margin settings and 14 from protected, inland waters of Baranof and Prince of Wales islands and in Lynn Canal, Muir Inlet and Yakutat Bay.

2.2. Surface sediment samples

In the late summer of 2004, twenty-seven multicores were collected aboard the RV Maurice Ewing (EW0408). Details about the core sites (latitude, longitude, water depth, multicore tube sampled) are given in Table V-1.

Surface sediment samples (typically 0–1 cm) from each core were obtained from the Oregon State University Core Repository (<http://corelab-www.coas.oregonstate.edu/>). Prior to sampling, each core had been split lengthwise and stored for ~1 yr in sealed D-tubes under refrigerated conditions (~4°C). Once the sediment samples were in-hand, they were immediately freeze-dried and homogenized in their glass containers by vigorous shaking and, if necessary, gentle grinding with a spatula. A more detailed description of the core collection and sample handling procedure is presented elsewhere (Walinsky *et al.*, 2009).

2.3. Biodegradation experiments

In the present study, three aerobic alkenone degradation experiments (Eh15, ATB4, TAB2 – each 20 day duration) were carried out isothermally (15°C) using sterile, freeze-dried *Emiliana huxleyi* cells (TWP1, Caen Algalbank) as the biomarker source material. Bacterial communities isolated freshly from living cultures of TWP1 were used as the inoculum. With the exception of a change in temperature, the experiments were designed and implemented as described by Rontani *et al.* (2008) for five incubations (20°C) of sterile, freeze-dried *E. huxleyi* cells with four bacterial communities isolated from *E. huxleyi* strain TWP1 cultures before (TAB) and after the algal cells had been treated with different antibiotics (ATB1, ATB2 and ATB3).

Chapitre V- Validité des températures mesurées à partir du paléothermomètre $U_{37}^{K'}$ à la surface des sédiments dans les hautes latitudes et autres zones océanographiques

Table V-1. Summary of alkenone and ancillary data obtained from analysis of SE Alaskan surface sediments.

Multicore (#)	Description	Lat (°N)	Lon (°W)	Depth (m)	TOC (wt%)	K37s (µg/g dry)	%K37s	%K38s	$U_{37}^{K'}$	%epK37:3 (of K37:3) ^a	%epK37:2 (of K37:2) ^a	ep $U_{37}^{K'}$ ^b	wSST ^c (°C)	maSST ^c (°C)	ssSST ^c (°C)
<i>South of icy strait</i>															
03 (2)	Trough West of Dall Island	54.816	133.278	193	3.0	2.15	49	45	0.404	1.6%	1.0%	0.302	6.4	9.0	12.2
06 (3)	Cordova Bay	54.969	132.745	400	3.9	3.32	48	45	0.443	1.6%	1.3%	0.380	6.4	9.1	12.4
15 (8)	Sumner Trough	55.588	134.675	268	0.62	0.46	50	44	0.459	7.1%	4.3%	0.341	6.1	8.8	12.1
10 (7)	Gulf of Esquibel	55.601	133.494	200	5.5	1.74	48	47	0.465	3.8%	2.8%	0.392	6.0	8.6	11.6
19 (7)	Crawfish Inlet	56.771	135.139	106	7.2	1.42	48	46	0.411	2.5%	1.7%	0.313	nd	nd	nd
25 (3)	Sitka Slope	56.792	136.152	1820	1.4	0.18	54	42	0.511	2.9%	1.8%	0.388	5.6	8.7	12.8
43 (1)	Deep Inlet	56.964	135.266	89	8.0	1.00	46	47	0.431	3.9%	2.2%	0.303	5.2	8.3	12.0
39 (2)	Outer Sitka Sound	57.009	135.495	205	4.5	1.94	47	46	0.435	4.9%	3.2%	0.337	nd	nd	nd
36 (2)	Sitka Sound	57.104	135.526	178	5.9	1.09	48	46	0.393	4.4%	2.9%	0.300	nd	nd	nd
32 (3)	Katlían Bay	57.157	135.363	151	4.7	1.12	48	46	0.417	1.2%	0.9%	0.347	nd	nd	nd
29 (3)	Nakwasina Inlet	57.184	135.415	119	5.2	0.77	49	45	0.414	2.1%	1.3%	0.314	nd	nd	nd
46 (5)	Slocum Arm	57.590	136.084	178	4.3	1.38	49	45	0.417	1.4%	0.9%	0.325	nd	nd	nd
65 (8)	Cross Sound	57.867	137.075	430	0.96	0.22	n.m.	n.m.	0.496	3.4%	2.4%	0.411	5.5	8.7	12.5
49 (7)	Lisianski Inlet	58.115	136.475	260	0.53	0.56	50	45	0.431	3.9%	2.7%	0.348	4.8	8.0	11.8
56 (8)	Lynn Canal	58.139	134.925	608	2.4	0.24	n.m.	n.m.	0.461	2.1%	1.4%	0.376	3.8	6.9	11.4
<i>North of icy strait</i>															
53 (8)	Upper Lynn Canal	58.797	135.194	263	0.84	n.d.							nd	nd	nd
59 (8)	Lower Muir Inlet	58.898	136.094	306	0.29	n.d.							nd	nd	nd
61 (7)	Upper Muir Inlet	59.062	136.254	265	0.30	n.d.							nd	nd	nd
68 (8)	Malispina Shelf	59.391	140.002	192	0.61	0.02	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	5.6	8.7	12.9
84 (7)	Khitrov Basin	59.530	144.132	686	0.82	0.12	n.m.	n.m.	0.471	n.a.	n.a.	n.a.	5.2	8.3	12.7
78 (8)	Malispina Shelf	59.555	141.691	148	0.51	0.03	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	5.4	8.4	13.1
91 (8)	Kayak Trough	59.648	145.155	198	0.40	n.d.							4.9	8.1	12.4
73 (7)	Yakutat Bay	59.640	139.610	253	0.64	0.09	n.m.	n.m.	0.505	n.m.	n.m.	n.m.	5.5	8.6	12.4
81 (8)	Bering Trough	59.943	143.728	176	0.43	0.14	49	45	0.443	4.1%	3.1%	0.370	5.3	8.2	12.6
101 (8)	Copper River Delta	60.147	145.663	125	0.56	n.d.							4.5	7.8	12.2
97 (8)	Hinchinbrook Entrance	60.560	146.772	401	0.38	n.d.							3.7	7.4	12.3
94 (8)	Upper Prince William Sound	60.664	147.708	744	0.78	n.d.							3.6	7.5	12.4

n.d., not detected; n.m., not reliably measurable; n.a., not analyzed.

^a Proportion (as percentage) of $C_{37:3}$ and $C_{37:2}$ epoxyketones measured relative to corresponding K37s using SIM (m/z 117) GC-MS response.

^b Unsaturation index based on measured abundance of respective epoxyketone derivatives for K37s (see Sections 3.3 and 4.1).

^c Winter, mean annual and summer SST – values extracted from the 2001 World Ocean Atlas (Quarter Degree Resolution) using Ocean Data View (<http://odv.awi-bremerhaven.de/home.html>).

2.4. Analysis of alkenones

A sub-sample (~2 g) of each sediment was analyzed for long chain alkenones. A description of the procedure employed for total lipid extraction, saponification and isolation of a ketone fraction containing these biomarkers by silica-gel column chromatography is provided in a companion paper (Walinsky *et al.*, 2009). C_{37} to C_{39} alkenones contained in the ketone fractions were further purified by urea adduction (Christie, 2003) and then analyzed by gas chromatography with flame ionization detection (GC–FID). GC–FID quantitation was done by an internal standard method using hexamethylbenzene (HMB), 3-methylheneicosane (ai C_{22}), and hexatriacontane (n C_{36}) as internal standards to assure reliable instrument performance. Individual alkenones were separated and quantified on an HP6890A GC–FID system equipped with a VF-1 fused silica column (60 m x 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness), a constant flow of hydrogen carrier gas (1.5 mL min⁻¹) and temperature programming (100–300°C at 5°C min⁻¹). The purity of several isolated alkenone fractions was checked by GC–electron impact mass spectrometry (EIMS) using an HP5971 benchtop mass selective detector interfaced to an HP5890A GC set-up and operated identically except using helium as the carrier gas.

All reported alkenone concentrations have been corrected for loss during sample preparation. Recovery correction was accomplished by addition of two standard surrogates: nonadecan-10-one, added to each sediment sample prior to the initial automated solvent extraction step (Walinsky *et al.*, 2009), and hexatricontan-2-one, added to each ketone fraction just prior to the urea adduction step. The recovery efficiency of nonadecan-10-one and hexatricontan- 2-one, measured by GC–FID analysis just prior to and after the urea adduction step, respectively, averaged $70 \pm 6\%$ and $98 \pm 4\%$.

2.5. Analysis of epoxyketones

Epoxide derivatives of alkenones were detected and quantified as corresponding diols after NaBH₄-reduction and subsequent silylation (Rontani *et al.*, 2001). For SE Alaskan sediment (Section 2.2) and bacterial incubation (Section 2.3) samples, the fraction of the total lipid extract containing these compounds was the same as that containing the alkenones (Rontani *et al.*, 2008). Epoxyketone analyses were performed using selected ion monitoring (SIM), GC–EIMS set up

with diagnostic ions at m/z 117 $[\text{CH}_3\text{-CH=O-TMS}]^+$, m/z 131 $[\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=O-TMS}]^+$, 512.5 (M^+ for the reduced epoxide of $\text{C}_{37:3}\text{-2TMSOH}$), 514.5 (M^+ for the reduced epoxide of $\text{C}_{37:2}\text{-2TMSOH}$), 526.5 (M^+ for the reduced epoxide of $\text{C}_{38:3}\text{-2TMSOH}$) and 528.5 (M^+ for the reduced epoxide of $\text{C}_{38:2}\text{-2TMSOH}$). C_{37} reduced epoxide products (as silylated derivatives) in each sample were quantified using the measured areas of their m/z 117 ion. Because authentic standards of these compounds were not available for calibration purposes, it was assumed that the m/z 117 response factor of each was identical to that for the m/z 117 ion of the corresponding reduced, silylated K37:2m and K37:3m precursor for which authentic standards were available. GC-EIMS was carried out with an Agilent 6890 gas chromatograph connected to an Agilent 5973 Inert mass spectrometer. The following conditions were employed: a fused silica capillary column coated with SOLGEL-1 (SGE; 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness); oven temperature programming from 70 to 130°C at 20°C min^{-1} , from 130 to 250°C at 5°C min^{-1} and then from 250 to 300°C at 3°C min^{-1} ; helium carrier gas main-tained at 0.69 bar until the end of the temperature program and then programmed from 0.69 bar to 1.49 bar at 0.04 bar min^{-1} ; injector (on column with retention gap) temperature, 50°C; electron energy, 70 eV; source temperature, 190°C; cycle time, 1.99 cycles s^{-1} , scan range, 50– 800 Th.

3. RESULTS

Surface sediment samples (0–1 cm) from the multicores (Table V-1) were examined for C_{37} to C_{39} alkenone content and composition. These biomarkers of specific haptophytes algal origin (Brassell, 1993) were only found in significant amounts in sediments from twenty of the twenty-seven sites (Fig. V-1).

The GC-FID chromatogram for the alkenone-containing ketone fraction isolated from these samples using our standard procedure (e.g., Prahl *et al.*, 1989b) and an extra saponification step (Walinsky *et al.*, 2009) was extraordinarily complicated in almost every case. Alkenone content and, in particular, compositional attributes such as the unsaturation index $U_{37}^{K'}$ (Brassell *et al.*, 1986) could not be quantified reliably due to the abundant presence of a C_{27} , C_{28} and C_{29} steryl – alkyl ether series like that previously described by Schouten *et al.* (2005). Evaluation of GC–

mass fragmentograms for m/z 369, 381 and 383 indicated that interference with the di-unsaturated alkenone, K37:2m, was due primarily to a component of the C27:1 steryl – alkyl series (m/z 369) and that interference with the triunsaturated alkenone, K37:3m, was due to components of both the C_{28:1} (m/z 383) and a C_{28:2} (m/z 381) steryl – alkyl series. The urea adduction procedure described above (Christie, 2003) circumvented this problem. As gauged by inspection of the resultant GC–FID trace, with confirmation by GC–EIMS analysis in several cases, this step effectively eliminated the interfering compounds (non-adducted) and, in 18 of the 20 cases, yielded a sufficiently clean alkenone (adducted) signature for reliable quantitative analysis by GC–FID (e.g., see Fig. V-2A).

3.1. Alkenone content

All sediments deposited south of Icy Strait, located at ~58°N in the study region (Fig. V-1), contained measurable alkenones concentrations. In this 15 sample subset, total C₃₇ alkenone concentration (K37s), dominated by the di- (K37:2m) and tri (K37:3m) -unsaturated compounds (Fig. V-2A), weakly correlated with the TOC content of the sediment ($r = +0.39$). Despite close proximity of these sites to land, terrestrial contribution to TOC is minor in the case of all of these sediments (Walinsky *et al.*, 2009). Hence, variability in the total organic carbon-normalized K37s concentrations, which ranged from 10 to 110 $\mu\text{g/gC}$, is most likely controlled in this set of samples by some other cause such as spatial differences in the phytoplankton ecology of surface waters and/or sedimentary diagenetic conditions.

Alkenones were only measurable in sediments at 5 of the 12 sites examined north of Icy Strait, with all 5 clustered in the vicinity of Yakutat Bay (Fig. V-1). K37s concentration in these relatively organic carbon-poor (~0.5% by weight) deposits was, on average, lower than that measured in those to the south (14.6 ± 11.0 versus 38.6 ± 30.7 $\mu\text{g/gC}$; Table V-1). However, the significance of this perceived compositional difference (Student t-test, $p = 0.11$) is further diminished given the terrestrial contribution to TOC in these northern sediments has been assessed as 25–50% (Walinsky *et al.*, 2009).

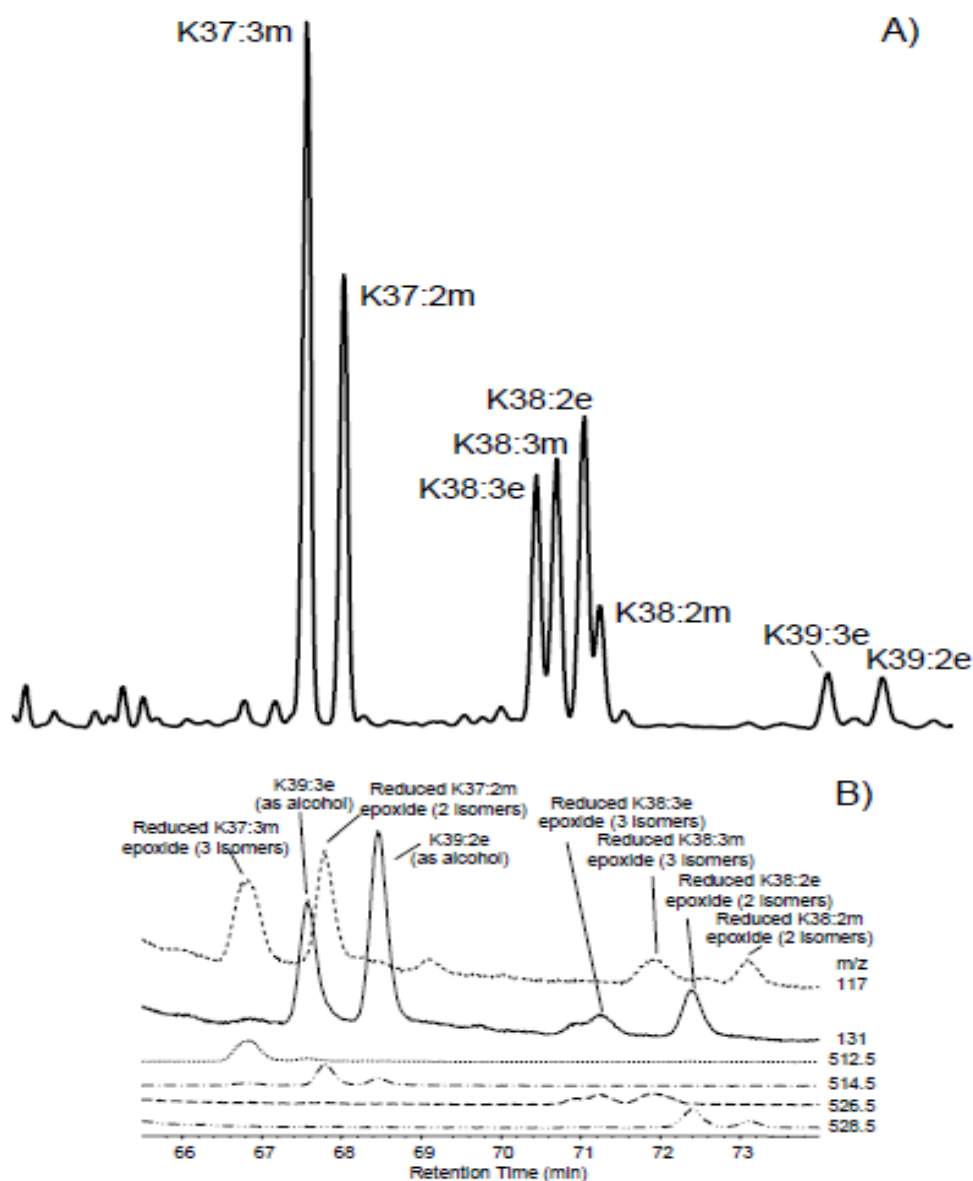


Fig. V-2. (A) Example of a gas chromatogram obtained from GC–FID analysis of alkenone fractions. Chromatographic peaks corresponding to the tri-unsaturated (K37:3m) and di-unsaturated (K37:2m) C_{37} methyl ketones and the similarly unsaturated (:3, :2), C_{38} (K38) and C_{39} (K39) methyl (m) and ethyl (e) ketones are labeled. (B) Partial m/z 117, 131, 512.5, 514.5, 526.5 and 528.5 mass fragmentograms from GC–EIMS analysis showing the presence of diols (as silylated derivatives) produced from $NaBH_4$ reduction of epoxyketones in the alkenone fractions. See experimental section for further details about this analytical procedure and the diagnostic mass spectral ions employed to identify and quantify these bacterial oxidation products of alkenones.

3.2. Alkenone composition

$U_{37}^{K'}$ values was quantified reliably in only 18 of the 20 samples containing detectable alkenone signals. Measurement of $U_{37}^{K'}$ values was compromised in both Malispina shelf samples (multicores 68 and 78) due to very low K37s concentration ($\sim 0.025 \mu\text{g g-dry-sediment}^{-1}$, Table V-1) and the presence of overlapping peaks in the GC-FID chromatogram which could not be removed by the urea adduction treatment.

Figure V-3A shows a plot of water temperature estimates for the 18 samples. In the complete data set, values ranged from 10.4°C to 13.9°C , averaging $11.8 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ (1σ). As illustrated, there is no apparent difference between data for sites located north and south of Icy Strait.

Another compositional attribute of the alkenone fingerprint that was analyzed reliably in 14 of the samples was the percentage of total C_{37} , C_{38} and C_{39} alkenones (Fig. V-2A) accounted for by the C_{37} and C_{38} components (%K37 and %K38, respectively). In this set of samples, %K37 and %K38 values (Table V-1) were tightly constrained, averaging $49 \pm 1.8\%$ and $45 \pm 1.2\%$, respectively. These values are essentially identical to those previously described (with equivalent $U_{37}^{K'}$ values) for surface sediments deposited along portions of the southern continental margin of Chile (Prahl *et al.*, 2006a), another high latitude, coastal setting.

3.3. Epoxide composition

SIM GC-EIMS analyses of silylated, NaBH_4 -reduced alkenone fractions allowed detection (e.g., Fig. V-2B) and quantification of C_{37} and C_{38} epoxyketones in all but two of the sediment samples where alkenones were detected and all of the samples from the bacterial degradation experiments. The proportions of epoxyketone products relative to the residual precursors, K37:2m and K37:3m, in the sediment samples ranged from ~ 1 to 4% and from ~ 1 to 7% , respectively (Table V-1). By comparison, proportions measured in samples from laboratory-controlled alkenone biodegradation experiments reached 4.5% for the epoxyketones resulting from K37:2m and $\sim 10\%$ for the epoxyketone resulting from K37:3m (Table V-2).

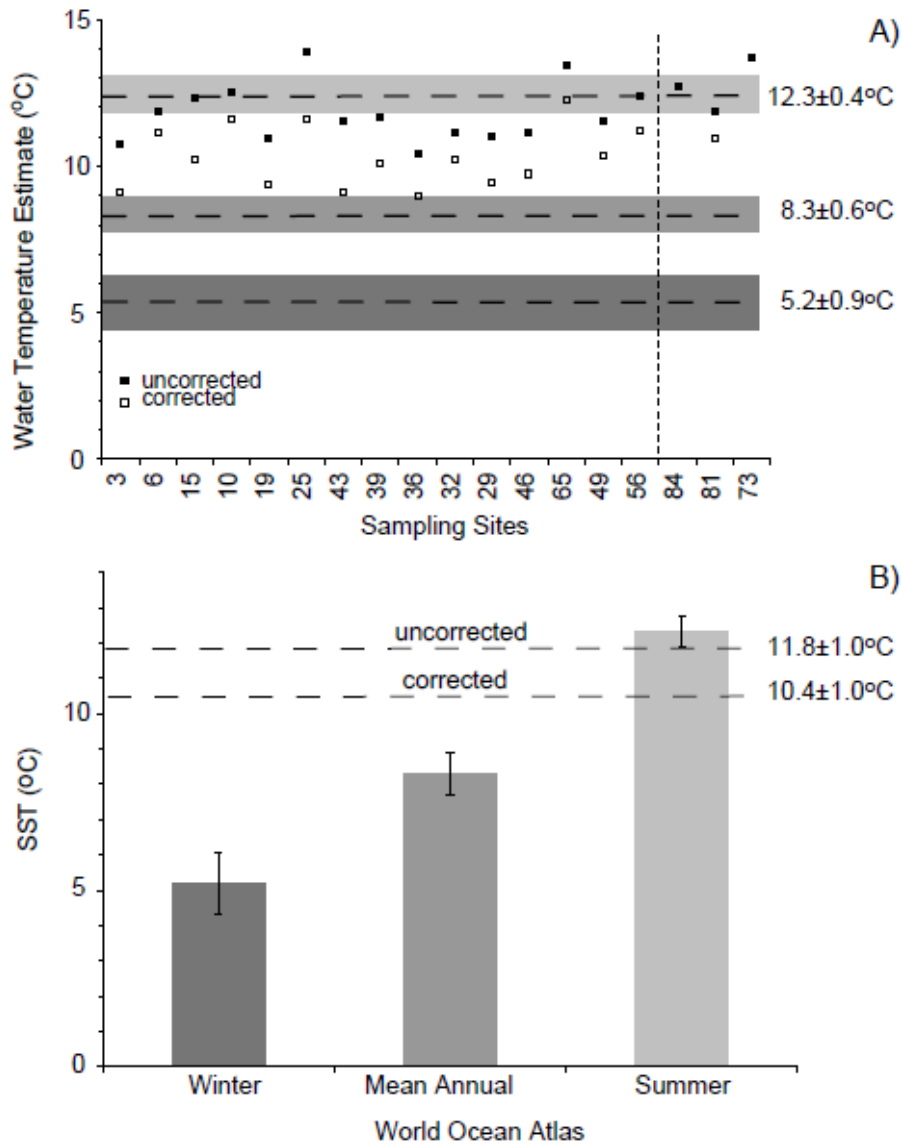


Fig. V-3. (A) Water temperature estimates derived using a standard calibration equation ($U_{37}^{K'} = 0.034T + 0.039$; Prahl et al., 1988) from $U_{37}^{K'}$ measurements uncorrected (filled squares) and corrected (open squares) for apparent "warming" effects gauged empirically by the epoxyketone composition detected in each sample (see text for further details). Sampling sites are arranged according to latitude with 03 (Trough West of Dall Island) being the most southerly ($\sim 54.8^\circ\text{N}$) and 81 (Bering Trough) the most northerly ($\sim 59.9^\circ\text{N}$). The vertical dotted line divides sites located south (left) and north (right) of Icy Strait ($\sim 58^\circ\text{N}$). (B) Comparison of the average $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimate derived from analysis of surface sediments throughout our study area ($11.8 \pm 1.0^\circ\text{C}$) with mean sea-surface temperature (SST) reported for winter ($5.2 \pm 0.9^\circ\text{C}$), annual ($8.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$) and summer ($12.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$) time frames in this region (see Table V.1 and text for further details).

The similarity of epoxyketone proportions detected in some of the sediment samples investigated relative to values measured in our controlled aerobic bacterial incubations indicates that significant metabolic alteration of alkenones has occurred at some stage of the depositional process for the Alaskan surface sediments. More importantly, differences in the relative proportion of these epoxyketone products to the respective residual alkenone precursor indicates this biological transformation operated in all cases compound selectively.

Concerns that epoxyketones have formed as artefacts during sediment storage cannot be fully discounted. However, prior work (Rontani *et al.*, 2006b) showed that autoxidative degradation of alkenones mainly affords allylic hydroperoxides and no detectable amounts of epoxides. Thus, an artifact caused by an abiotic oxidation mechanism seems unlikely. Alternatively, some fraction of the epoxyketones in the sediment samples may have formed as an artefact of microbial degradation that conceivably occurred during the ~1 year, cold (4°C) storage period of the cores in the OSU repository prior to our sub-sampling. However, assuming that: (i) biodegradation processes act at similar rates under natural and storage (nearly equivalent temperatures) conditions and (ii) the average age of the sediments investigated in a 1 cm thick sample interval (neglecting bioturbation effects) is ~12 yrs (Walinsky *et al.*, 2009), we conclude that biotic storage artifacts were unimportant and $U_{37}^{K'}$ values in all of our sediments have been increased by a biotic process that occurred naturally in the sedimentary environment.

Table V-2. Summary of results from analysis of epoxyketones in samples from laboratory experiments involving controlled aerobic microbial degradation of alkenones contained within *E. huxleyi* cell debris.

Bacterial community	K37s %degraded ^d	%epK37:3 (of K37:3) ^e (%)	%epK37:2 (of K37:2) ^e (%)	ep $U_{37}^{A'}$	$U_{37}^{A'} - \text{ep}U_{37}^{A'}$	Warming Effect ^f (°C)
ATB2 ^a	45	3.9	3.0	0.716	0.050	0.3
ATB2 (repeat) ^{a,c}	27	5.0	4.5	0.741	0.020	0.0
ATB3 ^a	33	10.1	3.5	0.725	0.158	3.5
ATB4 ^b	7	2.2	2.0	0.159	0.017	0.1
Eh15 ^b	47	3.9	3.4	0.164	0.022	0.3
TAB ^a	40	2.9	1.6	0.719	0.108	2.0
TAB (repeat) ^{a,c}	38	1.2	0.6	0.711	0.117	2.0
TAB ^b	85	1.5	1.2	0.159	0.031	0.4

^a Data from experiments run by Rontani *et al.* (2008).

^b Data from experiments run in this study.

^c Duplicate incubation experiments.

^d Percentage of K37s degraded relative to quantity in original starting material.

^e Proportion (as percentage) of C_{37:3} and C_{37:2} epoxyketones measured relative to corresponding K37s at end of experiment using SIM (*m/z* 117) GCMS response.

^f Apparent 'warming effect' = 110x² + 4.84x, where x = $U_{37}^{A'} - \text{ep}U_{37}^{A'}$ (see Fig. 4 and text for further information).

4. DISCUSSION

The tightly-constrained water temperature estimates derived from $U_{37}^{K'}$ analysis throughout our study area averaged $11.8 \pm 1.0^\circ\text{C}$ (Fig. V-3B). To interpret this finding, values of mean annual sea surface temperature (maSST) as well as mean summer and winter SST for waters overlying each core site were obtained from the 2001 World Ocean Atlas (Table V-1). As illustrated in figure V-3B, the average $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimate significantly over-predicts the regional maSST. It is warmer by $\sim 4^\circ\text{C}$ and much more consistent with the regional mean summer SST. This finding conflicts with the standard starting premise of paleoceanographic investigations that $U_{37}^{K'}$ values measured in marine surface sediments encode a record of maSST for a given oceanographic environment (Herbert, 2003).

4.1. Diagenetic bias

In the early development of alkenone paleothermometry, diagenesis was discounted as a significant factor in alteration of $U_{37}^{K'}$ values (e.g., Prahl *et al.*, 1989a; McCaffrey *et al.*, 1990; Teece *et al.*, 1998). However, investigation of further sedimentary evidence (Hoefs *et al.*, 1998; Gong & Hollander, 1999; Kim *et al.*, 2009) and results from refined laboratory incubation experiments (e.g., Rontani *et al.*, 2006a,b, 2008) has revealed that $U_{37}^{K'}$ values are sensitive to alteration. They can be shifted positively as a consequence of compound selective (K37:2m > K37:3m) degradation under aerobic and perhaps even anaerobic conditions, thereby leading to an apparent diagenetic bias of the $U_{37}^{K'}$ -encoded temperature signal. In aerobic bacterial incubation experiments, epoxyketone products of the decomposition process, exhibiting greater alteration of K37:3m than K37:2m, were detectable as a sign that selective loss of alkenones had led to a positive shift in $U_{37}^{K'}$ values (Rontani *et al.*, 2008).

Given data for epoxides deriving from K37:2m and K37:3m (%epK37:2, %epK37:3) and for $U_{37}^{K'}$ in our set of SE Alaskan sediment samples (Table V-1), values were calculated for an index

($epU_{37}^{K'}$) defined to gauge the unsaturation pattern of this diagenetic signature ($epU_{37}^{K'} = [epK37:2] / ([epK37:2] + [epK37:3])$). As observed for the bacterial incubation experiments (Table V-2), $epU_{37}^{K'}$ values were in every case less than the $U_{37}^{K'}$ value calculated from alkenone measurements in the respective sample (Table V-1). The difference between $U_{37}^{K'}$ and $epU_{37}^{K'}$ ranged from +0.063 to 0.13, averaging +0.093. Consistently positive differences provide evidence that the reaction has occurred compound specifically, with K37:3m displaying greater reactivity than K37:2m. Consequently, $U_{37}^{K'}$ values measured in these sediments have been shifted positively to some extent, or diagenetically "warmed".

If the epoxyketones of K37:2m and K37:3m were conservative oxidative transformation products and built up quantitatively in the sediment, the absolute magnitude of the diagenetic "warming" effect could be determined unambiguously by a mass balance calculation. The epoxyketones in these samples were detected at ~3% of that measured for the corresponding alkenones (0.9–4.3% for K37:2m and ~1.2–7.1% for K37:3m, Table V-1). On this basis, selective microbial degradation of alkenones would be perceived as having had little or no consequence on $U_{37}^{K'}$ -based temperature estimates. As shown by the laboratory incubation experiments, however, the epoxyketones are not conservative products, but rather are metastable intermediates in the microbially mediated, alkenone degradation process (Table V-2 and Rontani *et al.*, 2008). Consequently, the impact of compound selective degradation on $U_{37}^{K'}$ values could be quite different than such a simple mass balance calculation would suggest.

In an attempt to constrain the magnitude of this diagenetic "warming" effect empirically, the data from our microbial degradation experiments (Table V-2) were examined in finer detail. Given the occurrence of compound selective degradation, the increase in $U_{37}^{K'}$ (or "warming" effect) was assessed from the magnitude of change in the value of the index caused by the incubation using a conversion factor of 1°C per 0.034 units of $\Delta U_{37}^{K'}$ (Prahl *et al.*, 1988). In the eight experiments, the perceived "warming" effect on $U_{37}^{K'}$ varied from 0 to 3.5°C (Table V-2). Using quantitative data for the detected epoxyketone derivatives of K37:2m and K37:3m, $epU_{37}^{K'}$ values were calculated and subtracted from the $U_{37}^{K'}$ value measured in the corresponding sample ($U_{37}^{K'} - epU_{37}^{K'}$, Table V-2). A scatter plot of the perceived positive shift in $U_{37}^{K'}$ values (i.e., "warming"

effect) versus $U_{37}^{K'} - epU_{37}^{K'}$ yielded a trend (Fig. V-4) that is well described by a quadratic equation when the fit is forced through the origin, i.e., the experimental starting constraint ($y = 110x^2 + 4.84x$, $r^2 = 0.987$). Given this equation as an empirical calibration and similar decomposition rates of epoxyketones derived from K37:2m and K37:3m, estimates of the apparent diagenetic "warming" effect on the $U_{37}^{K'}$ values encoded in sediments from our study area ranged from +0.7 to 2.4°C, averaging +1.4°C (Fig. V-3). This assumption is based on the very high reactivity of the epoxide group. In order to avoid the reaction of this functionality with cell components (e.g., proteins and DNA), bacteria generally attack the epoxide group directly (Swaving & De Bont, 1998). Such an attack (mainly involving glutathione transferases and epoxide hydrolases; Swaving & De Bont, 1998) should be independent of the remaining number of double bonds in the alkyl chain of epoxyalkenones and thus non-selective.

Assuming this empirical method of accounting for microbially mediated, diagenetic "warming" is valid, appropriately adjusted water temperature estimates are still significantly higher than maSST (Fig. V-3). Consequently, another explanation is required for why $U_{37}^{K'}$ -based SST estimates for our subarctic study region disagree so conspicuously with maSST and consequently the global core-top calibration (Müller *et al.*, 1998).

4.2. Impacts of seasonality

From the biological oceanographic perspective, finding $U_{37}^{K'}$ -based SST estimates shifted toward the summer season is not a phenomenon without precedent in the alkenone literature or an unreasonable one for the present study region. Based on results from detailed water column and surface sediment work, Sikes *et al.* (1997) concluded that sedimentary alkenone compositions in the southern ocean are dominated by a contribution from summer, the season when productivity of the relevant haptophytes (Brassell, 1993) and, therefore, flux of this biomarker signal to sediments, is likely to be greatest. Although no study of alkenone-producing haptophytes has yet been done for SE Alaskan coastal waters, primary production in this subarctic environment is highly seasonal for clear biological oceanographic reasons (Stabeno *et al.*, 2004). In winter, cold conditions and winds associated with storms weaken stratification, leading to deep mixing. This factor in combination with low sun angle, shorter photoperiod and persistent cloud cover

effectively limits primary production. In summer, however, primary production in this region, where large scale, typically cyclonic circulation (Fig. V-1) does not lead to upwelling conditions, is nonetheless favored by thermal and freshwater stratification, and by improved light conditions from high sun angle and long photoperiod. These environmental controls on the productivity pattern for the overall phytoplankton community almost certainly control the productivity of alkenone producers in this setting as well.

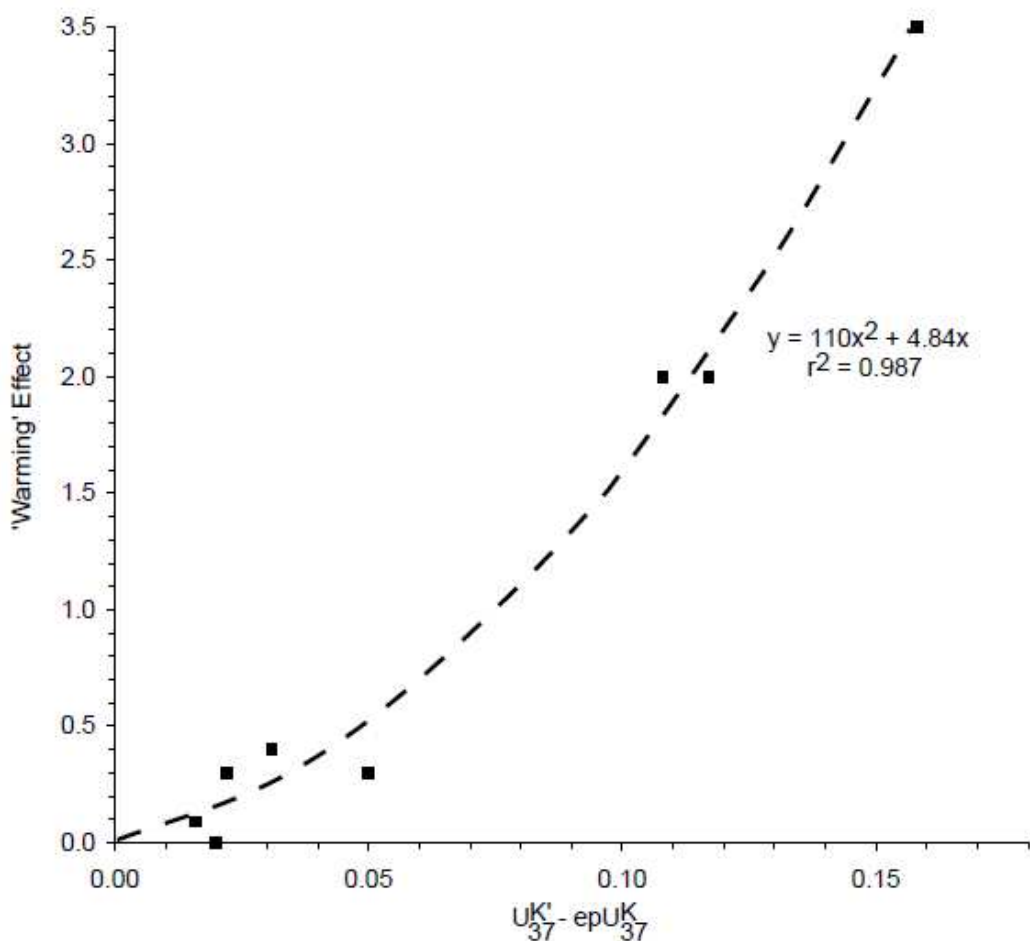


Fig. V-4 . Empirical calibration of apparent diagenetic "warming" effect on $U_{37}^{K'}$ values caused by compound selective decomposition of alkenones in cell debris from *E. huxleyi* by microbial communities under laboratory-controlled, aerobic incubation conditions (data from **Table V-2**). The dashed curve ($y = 110x^2 + 4.84x$, $r^2 = 0.987$) represents a quadratic best-fit of the complete experimental data set summarized in **Table V-2**. Refer to the text for further details.

If the alkenone unsaturation index represents a robust, biochemically well-behaved temperature proxy, the apparent summer correspondence of $U_{37}^{K'}$ -based SST estimates with the SE Alaskan summer season is reassuring. It reinforces belief that the original laboratory-based calibration equation ($U_{37}^{K'} = 0.034T + 0.039$), defined for a single strain of *E. huxleyi*, isolated from Station PAPA in the subarctic Pacific (Prahl *et al.*, 1988), yields accurate measures of water temperature in natural ocean settings. More significantly, however, it calls into question whether "residuals" in the linear global calibration equation for $U_{37}^{K'}$ versus maSST are entirely random (Herbert, 2003), thereby masking any useful information about secondary controls on values set by this index, such as seasonality (e.g., Harada *et al.*, 2006 and references therein) and depth (e.g., Prahl *et al.*, 2001 and references therein) of production or physiological status of the cells contributing to export (e.g., Prahl *et al.*, 2006a; Sikes *et al.*, 2005 and references therein).

In order to address the issue of a systematic biogeographical pattern to the model "residuals", a set of $U_{37}^{K'}$ data was assembled that includes values measured in surface sediments deposited all along the continental margin off the west coast of North and South America and beneath open ocean waters from the North Atlantic. Water temperature estimates were calculated for each $U_{37}^{K'}$ value using the original calibration equation for *E. huxleyi* (see above), which is statistically identical to the global core-top calibration (Müller *et al.*, 1998). A model "residual" was then calculated by subtracting the expected 2001 World Atlas maSST value for each core location from the respective $U_{37}^{K'}$ -derived water temperature estimate.

A map of these results (Fig. V-5A) clearly illustrates the magnitude of the "warm" mismatch between predicted and expected maSST for our SE Alaskan study region. It also shows that a similar magnitude of mismatch in the temperature prediction characterizes data for North Atlantic surface sediments. For similar environmental reasons, primary productivity in the high latitude North Atlantic should also be highly seasonal and partial toward the summer. The map of model "residuals" (Fig.V-5A) suggests that the apparent summer-skew in $U_{37}^{K'}$ values recorded in sediments from our subarctic study area is not a random, regional anomaly, but depicts a more widespread high latitude phenomenon as Sikes *et al.* (1997) suggested may be the case based on findings from their Southern Ocean work. Given that a summer production and export dominance accounts for the apparent "warm" offset in $U_{37}^{K'}$ data for surface sediments in our study area and

the North Atlantic, this biogeochemical feature would also be expected to characterize the record for surface sediments collected southernmost in the Pacific along the Chile margin. Examination of the map in figure V-5A shows an apparent "warming" offset in temperature predictions in this vicinity, however, the offset is far less conspicuous ($\sim 1^{\circ}\text{C}$) than that apparent at equivalent high latitudes in our SE Alaskan study area or in the open North Atlantic ($\sim 4^{\circ}\text{C}$).

This observation would seem to diminish the idea developed above that $U_{37}^{K'}$ -derived water temperature estimates generally gauge summer SST and not maSST in high latitude ocean settings. However, a plot of winter, summer and annual SST means for sites situated between 60°N and 60°S in the Pacific along the continental margin of North and South America (Fig. V-5B) shows the seasonal temperature contrast is much smaller in the southern hemisphere than at the equivalent latitude in the northern hemisphere. For example, the difference between summer and mean annual SST at 50°S and 50°N is ~ 1.5 and $\sim 4^{\circ}\text{C}$, respectively. Thus, a summer offset in alkenone production for the southernmost sites along the Chilean margin would not display as large of a difference between summer and mean annual SST as apparent in the subarctic Pacific. Extension of this analysis to the Atlantic Ocean reveals a similar pattern for the summer – mean annual SST difference ($\sim 1^{\circ}\text{C}$ at 50°S versus $\sim 3^{\circ}\text{C}$ at 50°N). Thus, summer skewing can provide a viable explanation for the conspicuously warmer than maSST $U_{37}^{K'}$ -based temperature records in surface sediments from SE Alaska and the North Atlantic and the subtly warmer SST estimates for high latitude sediments along the Chilean margin (Fig. V-5A).

4.3. Other conspicuous biogeographic patterns in model "residuals"

Our map of model "residuals" (Fig. V-5A) identifies three lower latitude oceanographic regions (Gulf of California, Peru Upwelling Zone, offshore transect along $\sim 40^{\circ}\text{N}$ in NE Pacific) where the pattern for prediction error also appears non-random.

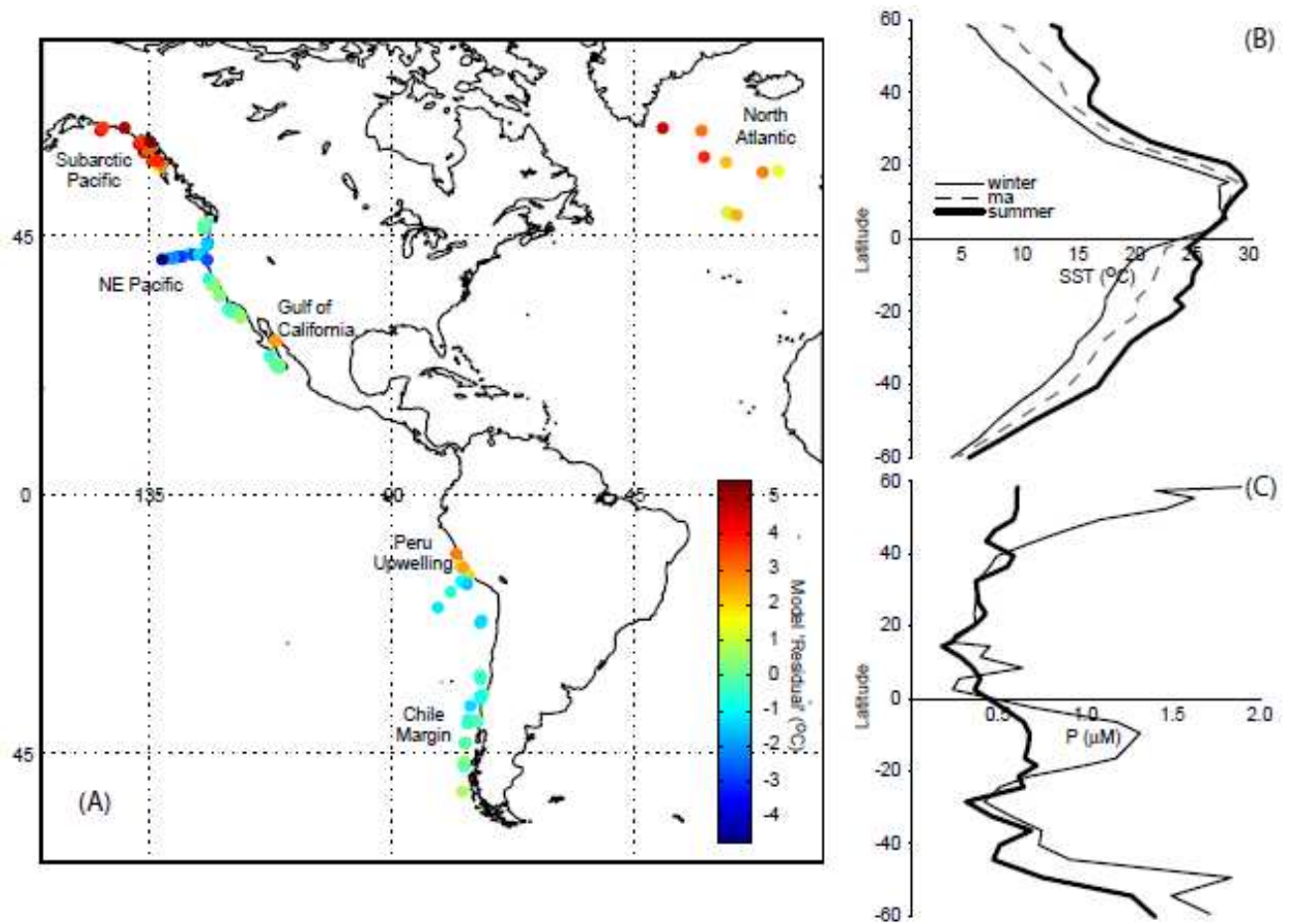


Fig. V-5. (A) Map of "residual" between $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimate for surface sediment and mean annual sea-surface temperature (maSST) in waters overlying the site where each core-top sample was collected. The magnitude of the model "residual" in temperature ($^{\circ}\text{C}$) at each site is indicated by the color of the filled circle (see colorbar for scale). The mapped data set includes samples from: our study area in the subarctic Pacific Ocean (Table V-1), the NE Pacific continental margin extending from the tip of Baja to the Washington coast (Prahl et al., 1988; Doose et al., 1997; Herbert et al., 1998; Electronic annex), the Gulf of California (Goni et al., 2001), the SE Pacific along the Peru–Chile continental margin (McCaffrey et al., 1990; Prahl et al., 2006a) and the open ocean in the subarctic North Atlantic (Rosell-Melé et al., 1995b). $U_{37}^{K'}$ -based water temperature estimates were calculated using the standard calibration equation ($U_{37}^{K'} = 0.034T + 0.039$) of Prahl et al. (1988). maSST values were obtained for each sampling site from the 2001 World Ocean Atlas (<http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOA01/woa01dat.html>). Graphs to the right of the map show: (B) winter, mean annual and summer SST and (C) winter and summer phosphate concentrations measured in surface waters as a function of latitude along the Pacific continental margin of North and South America. These data were also obtained from the 2001 World Ocean Atlas.

These observations provide further evidence that secondary, but not necessarily insignificant controls (i.e., season and depth of production and the physiological status of the cells contributing to export) on values set by $U_{37}^{K'}$ measured in sediments drive the deviation about the global core-top calibration.

For example, $U_{37}^{K'}$ values preserved in surface sediments from Guaymas Basin in the Gulf of California encode a water temperature of 25.4°C (Goni *et al.*, 2001), which is ~2.5°C warmer than maSST reported in the World Ocean Atlas. By means of a multiyear sediment trap times series study, Goni *et al.* (2001) documented that alkenone flux was not constant throughout the year or highest in winter, when upwelling prevails and overall primary production is highest in the region. Rather, it peaks in summer when surface waters are highly stratified and ocean color suggests the system is relatively non-productive (Santamaria-Del- Angel & Alvarez-Borrego, 1994). Furthermore, the $U_{37}^{K'}$ signal of average sediment trap particles yielded a water temperature estimate significantly warmer than maSST determined from an AVHRR satellite record. On this basis, they ascribed a summer dominance of alkenone export production as the probable cause. This finding is noteworthy because it illustrates, from an ecological standpoint, a decidedly different sort of seasonal skewing than that described for the high latitude settings – i.e., one where knowledge of overall productivity trends is not entirely informative.

The Peru Upwelling Zone also displays a significant positive model "residual" (Fig. V-5A) of $2.1 \pm 0.7^\circ\text{C}$. This value represents the average of $U_{37}^{K'}$ values measured in five surface sediments (McCaffrey *et al.*, 1990; Prahla *et al.*, 2006a) deposited in a portion of the upwelling zone lying between 11.1° to 15.1°S and 75.6° to 78.1°W that is characterized throughout by a large seasonal change in SST (~6 to 7°C; Fig. V-5B). The period of most intense upwelling, marked by lowest SST in winter, is also when surface waters display highest nutrient concentrations (Fig. V-5C). The perceived positive model "residual" for this region could be explained in the same way as for the Gulf of California case. That is, the integrated alkenone signature in sediments from the Peru Upwelling Zone is skewed seasonally by export production dominance in summer when surface waters are warmest, nutrients are least available and the relevant haptophytes thereby may have an ecological advantage over diatoms. Unfortunately, unlike the Gulf of California case, there is no long-term sediment trap time series data for alkenones to corroborate this interpretation.

The NE Pacific around 40°–42°N represents a third region (Fig. V-5A) where the model "residual" appears conspicuously non-random. In this example, however, the deviation is not positive but rather negative by several degrees Celsius. Furthermore, north and south of this demarcation, along the stretch of continental margin spanned by the California Current (Hickey, 1979), $U_{37}^{K'}$ -based temperature estimates display good agreement with maSST.

The NE Pacific region around ~40°N is characterized during the spring-summer upwelling season by filaments of cold, high chlorophyll water that extend from the coastal zone to more than 200 km offshore (e.g., Abbott & Zion, 1985). These filaments depict offshore jets which develop episodically in response to strong southward flowing, nearshore, upwelling currents spun up by rapidly changing local wind stress. The jets are directed offshore at ~40°N by instability phenomena influenced by factors such as hydrographic convergence and steering by prominent headlands along the coastline (Strub *et al.*, 1987). Such cold coastal jets provide a mechanism not only for offshore transport of upwelled nutrients, but also for supporting an otherwise unusual level of primary production offshore (Barth *et al.*, 2002). If these frequently injected water parcels act as batch cultures (e.g., Prah *et al.*, 2003), "cold" upwelling signatures for $U_{37}^{K'}$ could be made to look even "colder" due to the non-thermal physiological effect of nutrient stress on alkenone biosynthesis (e.g., Prah *et al.*, 2006a). If this scenario does explain the observation at ~40°N (Fig. V-5A), then one would expect to see such a pattern in model "residuals" along other coastal margins. Cold, filamentous features stretching seaward of upwelling centers are not unique to the NE Pacific but rather are a common phenomenon associated with eastern boundary current dynamics (Barth *et al.*, 2002).

The explanation just outlined, however, cannot account completely for the apparent "cold" feature in model "residuals" at ~40°N (Fig. V-5A) since the influence of coastal jets on offshore NE Pacific waters is restricted to ≤ 300 km (e.g., Barth *et al.*, 2002) while the feature extends ~600 km offshore. In the ocean interior adjacent to the NE Pacific coastal margin, surface waters are deeply mixed in winter but become thermally stratified beginning at the spring transition and remain so throughout the summer and fall period. A two-layered euphotic zone develops (Coale & Bruland, 1987; Small *et al.*, 1987), characterized by a nutrient-poor, warm surface mixed layer (SML) overlying a nutricline often marked by an associated deep chlorophyll maximum layer (DCML). Carbon export from such systems to underlying sediments derives disproportionately

from the lower layer (e.g., Coale & Bruland, 1987). Various studies conducted throughout the world have reported evidence that the DCML in such settings is the locus of alkenone production and export to sediments (e.g., Prahl *et al.*, 1993, 2001; Ternois *et al.*, 1996; Bentaleb *et al.*, 1999; Ohkouchi *et al.*, 1999; Prahl & Popp, 2007). Export of the $U_{37}^{K'}$ signal from the DCML would lead to temperature estimates colder than maSST and may explain the conspicuous "cold" offset in the model "residuals" which extends beyond the region of apparent coastal jet influence.

5. CONCLUSIONS

Analysis of model "residuals" for maSST estimates and mapping of results stimulated by our study of alcénones in coastal SE Alaskan sediments provides several examples of locations where deviation from the global core-top temperature calibration for $U_{37}^{K'}$ appears to be driven by recognizable oceanographic processes. Useful information about secondary controls on values set by this paleoproxy is likely contained in the "scatter" about the global calibration line. Intuitively, the degree that biological processes such as seasonal export and non-thermal physiological impacts on alkenone biosynthesis or resuspension and lateral transport processes (e.g., Benthien & Müller, 2000; Ohkouchi *et al.*, 2002; Mollenhauer *et al.*, 2003, 2006) act to set $U_{37}^{K'}$ values recorded in sediments should not be the same everywhere in the ocean today. To some degree, biogeographic patterns should be present and results from our model "residual" mapping exercise suggest this case is so. It is also unlikely that biogeographic patterns would necessarily remain fixed through time. Temporal variations caused by changes in seasonal upwelling conditions or stratification or in boundary current dynamics, for example, may act to shape the down core record for $U_{37}^{K'}$ at a given site and thereby potentially bear significantly on the paleoceanographic interpretation. Although these are now well appreciated concerns, such factors have not yet been accounted quantitatively when alkenone thermometry is employed. The need to develop methods to do so, for $U_{37}^{K'}$ measurements as well as for measurements of other biotic proxies used routinely for paleoceanographic and paleoclimate reconstruction purposes, is becoming more and more apparent (e.g., Haug *et al.*, 2005; Mix, 2006).

Acknowledgments

We thank Alan Mix, Nick Pias and other cruise participants as well as the captain and crew of the RV Maurice Ewing for making possible the collection of sediment samples analyzed in this study. We are also grateful to John Volkman for help interpreting mass spectra for the sterol – alkyl ethers and to Matthew Wolhowe, Elizabeth Sikes, two anonymous reviewers and the Associate Editor for constructive reviews of the original manuscript. Funding for this research was provided by grants from the US National Science Foundation (OCE-0326573, 0350409 and 0242084) and from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de la Méditerranée.

Appendix A. supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.gca.2009.09.027.

CHAPITRE VI

**La dégradation de la matière organique
particulaire dans l'océan Pacifique équatorial:
Biotique ou abiotique ?**

AVANT-PROPOS

Dans ce chapitre nous avons étudié le devenir de la matière organique dans des particules en suspension ($\leq 10^2 \mu\text{m}$) et prélevées par trappes ($\geq 10^2 \mu\text{m}$) dans l'océan Pacifique équatorial. La quantification de différents produits de dégradation lipidiques (chlorophylle, acide oléique, acide vaccénique, stérols et alcénones) spécifiques des processus de biodégradation, de photo-oxydation et d'autoxydation, nous a permis d'estimer le rôle joué par les processus biotiques et abiotiques lors de la dégradation de la matière organique particulaire. L'importance de chaque processus de dégradation est apparue fortement dépendante de la classe de lipides considérée et de la classe de taille des particules auxquelles la matière organique particulaire est associée. Dans cet avant-propos, nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur le devenir des alcénones dans cette région géographique de l'océan Pacifique équatorial en mettant l'accent sur un résultat inédit concernant la relation étroite semblant exister entre les cellules phytoplanctoniques et les bactéries hétérotrophes qui leur sont associées.

Les différentes observations effectuées lors de cette étude ont mis en évidence l'existence d'un lien entre l'état de photo-oxydation des cellules phytoplanctoniques sénescents et leur apparente récalcitrance à la dégradation biotique. En effet, les produits de biodégradation se sont révélés généralement plus abondants dans les particules prélevées par trappes que dans les particules en suspension où à l'inverse une forte photo-oxydation a pu être observée. Ce phénomène a été attribué à un transfert d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) lors de la sénescence des cellules algales vers les bactéries hétérotrophes aérobies qui leur sont associées. En effet, dans les phytodétritus, la production d' $^1\text{O}_2$ lors de l'excitation de la chlorophylle aboutit à la saturation des mécanismes photoprotecteurs, l' $^1\text{O}_2$ peut alors migrer à l'extérieur des chloroplastes et induire la photodégradation des composés lipidiques insaturés des bactéries hétérotrophes associées aux cellules phytoplanctoniques. L'absence de système photoprotecteur chez les procaryotes hétérotrophes entraîne des dommages cellulaires importants ayant pour conséquence d'inhiber leur croissance et de limiter ainsi la dégradation bactérienne. La quantification des produits de dégradation de l'acide vaccénique (traceur bactérien spécifique) a permis de confirmer que les bactéries associées aux particules en suspension avaient subi une forte dégradation abiotique alors que les bactéries associées aux particules prélevées par trappes n'étaient que peu affectées par ces processus. Ces résultats suggèrent un transfert de l' $^1\text{O}_2$ des phytodétritus aux bactéries associées bien plus efficace dans les particules en suspension que dans les particules prélevées par trappes. Cette

différence s'expliquerait par une limitation du transfert de l' $^{18}\text{O}_2$ dans les particules collectées par trappes du fait de l'abondance de particules riches en silice (particules dominées par des agglomérats de diatomées) dont le caractère polaire réduirait la durée de vie de l' $^{18}\text{O}_2$.

Cette relation inverse entre l'importance relative de la biodégradation vs. photo-oxydation permettrait d'expliquer d'autres observations effectuées *in situ*. En effet, en mer Méditerranée la photo-oxydation apparaît être également le processus de dégradation prédominant dans les particules en suspension alors que la biodégradation semble n'y être qu'un processus mineur (Cf. Ch. IV). A l'inverse, dans les particules prélevées par trappes, la biodégradation est généralement prédominante.

Dans le matériel particulaire prélevé par trappes, une augmentation significative des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ (0,90 à 0,97) a été observée avec la profondeur. La détection d'époxyalcénones (présentant un degré d'insaturation plus élevé que les alcénones résiduelles) dans le matériel particulaire prélevé par trappes nous a conduit à attribuer l'augmentation significative des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ observée avec la profondeur (+0,07 équivalent à une augmentation de température de +2°C) à la présence de bactéries capables d'attaquer les doubles liaisons des alcénones de manière sélective. Nous avons pu ainsi confirmer le biais potentiel (déjà observé dans le chapitre précédent) que cette dégradation bactérienne aérobie sélective peut entraîner *in situ* sur le paléothermomètre $U_{37}^{K'}$.

Comme nous avons pu le voir précédemment (Cf. Ch. IV), les processus d'autoxydation peuvent également dégrader sélectivement les alcénones di- et tri-insaturées et par conséquent altérer de manière significative l'indice $U_{37}^{K'}$. L'absence de corrélation observée entre les variations de cet indice et les teneurs en produits d'autoxydation des stérols, de l'acide oléique et de la chaîne phytyle de la chlorophylle (traceurs indirects de l'autoxydation des alcénones, Cf. Ch. I- 5.2.2.3 et Ch. IV) avec la profondeur semble indiquer que les processus autoxydatifs ne jouent pas un rôle important lors de la dégradation des alcénones dans l'océan Pacifique équatorial.

Degradation of particulate organic matter in the Equatorial Pacific Ocean: Biotic or abiotic?

Rontani, J.-F., Zabeti, N., Wakeham, S.G.

Submitted to Limnology and Oceanography

ABSTRACT

The behaviour of organic matter (OM) in suspended and sinking particles in the equatorial Pacific Ocean (EqPac) was monitored by measuring lipid degradation products that are specific for biodegradation, photooxidation and autoxidation. The extent to which each degradation process is important varies depending on the lipid class being degraded and on the particle size class with which the lipids are associated. Photodegradation and autoxidation were significant for lipids that are associated with both suspended and sinking particles. Abiotically degraded terrestrial material strongly contributed to suspended particles and to sinking material in the deep ocean, probably as the result of incorporation of terrestrial particles into sinking aggregates. Analyses of degradation products of 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol and cholest-5-en-3 β -ol gave very useful information concerning the differential behaviour of phytoplanktonic, terrestrial and zooplanktonic organic matter, respectively. Planktonic lipids appeared to be more susceptible to biodegradation than terrestrial lipids. Moreover, biodegradation was more intense in sinking particulate organic matter (POM) than suspended POM, which we attribute to efficient transfer of singlet oxygen from suspended and senescent phytoplanktonic cells to associated bacteria and subsequent inhibition of heterotrophic degradation. It seems thus that there is a direct link between the photooxidation state of lipids of senescent phytoplankton cells in suspended particles and the apparent recalcitrance of lipids towards biotic degradation. Terrigenous/vascular plant OM, which is strongly autoxidized on land and/or in the atmosphere as it is transported to the remote ocean, is only weakly biodegraded during sedimentation in this open ocean setting. A significant increase in alkenone-based $U_{37}^{K'}$ values (+0.07 equivalent to an inferred temperature change of +2°C) was observed in sinking particles with depth and the detection of epoxyalkenones, further confirming the potential

detrimental effect of aerobic bacterial degradation processes on the $U_{37}^{K'}$ paleotemperature proxy.

Keywords: Equatorial Pacific Ocean; Lipids; Biotic and abiotic degradation; Suspended and sinking particles; Eolian transport.

1. Introduction

Particulate matter plays a major role in the oceanic carbon cycle. In addition to the mechanisms by which particulate organic matter (POM) is produced and transported through the ocean, the mechanisms by which it is degraded, and the relative importance of biotic vs abiotic processes in this degradation, are also important. Our goal here is to evaluate degradation mechanisms as determinants of the fate of marine POM.

Particles in the water column exist in a continuum of sizes (McCave, 1984)^{††}, with two classes usually operationally recognized (Bacon *et al.*, 1985; Wakeham & Lee, 1989). Fine material ($\leq 10^2$ μm diameter, hereafter termed “suspended particles”) sinks very slowly through the water column and consequently has a long residence time, yet constitutes most of the standing stock of particulate matter in the ocean. Large particles ($\geq 10^2$ μm , hereafter termed “sinking particles”) include zooplankton fecal pellets and marine snow aggregates and are numerically less abundant but are responsible for most the vertical flux of material from the upper ocean to the sea floor. Suspended particles are typically being collected by filtration, often *in situ*, whereas sinking material is commonly collected using sediment traps. Continual exchange (aggregation and disaggregation), the extent of which is uncertain (Bacon *et al.*, 1985; Wakeham & Lee, 1989; Hill, 1998), will have profound effects on particle settling velocity, residence times, and the efficiency of remineralization of particulate organic matter.

Suspended and sinking particles are markedly different. Variations in organic composition depend on POM source and degradation, along with physical processes that affect particle size and morphology. Suspended particles with long residence times in the water column might be expected *a priori* to contain more highly degraded organic matter than rapidly sinking particles (Tanoue & Handa, 1980). However, several field studies show the opposite,

^{††} Les références bibliographiques ont été centralisées à la fin du manuscrit

with surprisingly high abundances of relatively undegraded labile material in suspended particles (e.g. Lee *et al.*, 1983; Wakeham *et al.*, 1985; Wakeham & Canuel, 1988). Sheridan *et al.* (2002) observed that surface suspended particles (0-200 m) in the equatorial Pacific Ocean were less degraded than particles that quickly sink out of the euphotic zone. Abramson *et al.* (2010) compared suspended and sinking particles at the MedFlux site in the Ligurian Sea (NW Mediterranean) and found significant compositional differences between size classes suggesting that exchange between suspended and sinking pools might not only be limited in scope but also dependent on flux. The mechanism of POM degradation appears to vary according to particle size. Analysis of sterol degradation products of POM from the DYFAMED site, also in the Ligurian Sea, show that biotic (heterotrophic) degradation was important for sinking particles and increased with depth whereas abiotic degradation dominated the suspended particle pool (Rontani *et al.*, 2009b; Christodoulou *et al.*, 2009).

Although less widely studied than its biologically-mediated (heterotrophic) counterpart, abiotic degradation clearly can be important for the fate of POM. Abiotic processes generally fall into two categories, photooxidation (by visible light) and autooxidation (free radical degradation; reviewed by Rontani, 2008), and each yields different and diagnostic chemical products. Both photooxidation and autooxidation can affect lipids in senescent algal cells. The effects of photooxidation, however, may go beyond the initially affected algal cellular lipids. If the photochemical production of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$, resulting from excitation of algal chlorophyll) exceeds the quenching capacity of the photoprotective system (as may occur in photosynthetically-inactive senescent cells), $^1\text{O}_2$ can migrate outside the chloroplasts and induce degradation of components of attached heterotrophic bacteria (Rontani *et al.*, 2003a). Christodoulou *et al.* (2010) confirmed this process, whereby diagnostic degradation products of several bacterial fatty acids were generated during irradiation of non-axenic phytodetritus by solar light, but were lacking after irradiation of isolated bacteria (Abboudi *et al.*, 2008). Cellular damage resulting from the transfer of high amounts of $^1\text{O}_2$ to heterotrophic bacteria may be dramatic due to the lack of efficient photoprotective and antioxidant systems in these microorganisms (Garcia-Pichel, 1994). In an experiment using cultured non-axenic *Emiliana huxleyi* sp. TWP1 cells under consecutive light/dark, dark and light/dark regimes, transfer of singlet oxygen from senescent *E. huxleyi* cells to bacteria significantly inhibited bacterial growth (J.-F. Rontani, unpubl.). Such a transfer, resulting in production of high proportions of oxidation products of *cis*-vaccenic acid (a typical bacterial fatty acid, e.g., Sicre *et al.*, 1988), has also been observed for particulate matter *in situ* (Marchand & Rontani,

2001; Marchand *et al.*, 2005; Christodoulou *et al.*, 2009) and may help explain the relative recalcitrance of strongly abiotically degraded suspended POM towards biotic degradation as observed in the Ligurian Sea (Rontani *et al.*, 2009b), thus enhancing the apparent residence time of otherwise labile lipids in the deep ocean.

In the present work, we re-investigated lipids in suspended and sinking POM samples from the equatorial Pacific Ocean that had been analyzed previously (Wakeham *et al.*, 1997a; Sheridan *et al.*, 2002). Using specific lipid degradation products that have been proposed for distinguishing biotic from abiotic, and photooxidative from autooxidative, processes (e.g., Rontani, 2001; 2008; Rontani *et al.*, 2009b), we now compare the degradation state of lipids in these two classes of particles to evaluate the roles played by heterotrophic, photodegradative, and autooxidative processes in POM degradation. Particular attention was given to the photo- and autooxidation of lipids derived from heterotrophic bacteria as indicators of the behavior of particulate lipids.

2. Materiel and methods

2.1. Collection of the samples

Particle samples were collected in the equatorial Pacific during the U.S. JGOFS EqPac study in 1992. Suspended material was collected at 8 depths (15-850 m) using an *in situ* Multiple Unit Large Volume Filtration System (MULVFS; Bishop *et al.*, 1985) at the equator site (0°N, 140 °W) during cruise TN011 of R/V *Thomas Thompson* (EqPac survey cruise 2, August-September, 1992). MULFVS pumps filtered 1,000-15,000 l of seawater through a 53- μ m Nitex screen and collected suspended particles on two sandwiched 1- μ m pore size Microquartz (QMA) filters. All filters were stored frozen until subsequent processing in the laboratory at Skidaway Institute of Oceanography (Sheridan *et al.*, 2002). Sediment trap samples were collected at the equator site at a depth of 105 m (floating traps) and 955 and 3459 m (moored traps) (Wakeham *et al.*, 1997a). The floating trap sample investigated here represents a 3-day snapshot of sinking material during a non-El Niño summer (cruise TN011) period whereas the moored trap samples integrate a full year of particle flux (January 1992-January, 1993; Honjo *et al.*, 1999). The short-term floating trap contained no poison/preservative during its short deployment whereas moored traps were preserved with

formalin during the year-long deployment. Upon recovery of the respective traps, samples were sieved through an 850 µm mesh screen to remove zooplankton, split for multiple organic analyses (elemental composition, lipids, amino acids, carbohydrates, pigments; Hernes *et al.*, 1996; Wakeham *et al.*, 1997a,b; Lee *et al.*, 2000) and filtered onto ashed glass fiber filters. Lipid results have been described previously for both sediment trap material (Wakeham *et al.*, 1997a,b) and for suspended material (Sheridan *et al.*, 2002).

2.2. Lipid extraction

Sinking and suspended particles on filters were soxhlet-extracted using methylene chloride-methanol (2:1) overnight. Extracts were partitioned into the methylene chloride phase following addition of 5% NaCl, then dried over Na₂SO₄. Although extractions were initially carried out in 1993, unused aliquots have been stored in methylene chloride-methanol at -20°C since then.

2.3. NaBH₄ reduction

NaBH₄-reduction of the lipid extracts was carried out in order to reduce labile hydroperoxides resulting from photooxidation and autoxidation to alcohols that are amenable to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). During this treatment, ketones (and notably alkenones) are also reduced to the corresponding alkenols, and the possibility of some ester cleavage cannot be excluded. Total lipid extracts were reduced (30 min) in CH₃OH (10 ml) using excess NaBH₄ (10 mg/mg of extract).

2.4. Alkaline hydrolysis

Saponification was carried out on reduced samples. After NaBH₄ reduction, 10 ml of water and 0.6 g of potassium hydroxide were added and the mixture was directly saponified by refluxing for 2 h. After cooling, the contents of the flask were acidified with hydrochloric acid (pH 1) and subsequently extracted three times with dichloromethane. The combined dichloromethane extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated by rotary evaporation at 40°C.

2.5. Derivatization

After solvent evaporation, residues were taken up in 300 μ L of a mixture of pyridine and pure N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA; Supelco) (2:1, v/v) and silylated for 1 h at 50°C. After evaporation to dryness under a stream of N₂, the derivatized residues were taken up in a mixture of ethyl acetate and BSTFA (to avoid desilylation of fatty acids) for analysis using GC-MS.

2.6. Gas Chromatography - Electron Impact Mass Spectrometry (GC-EIMS)

Compounds were identified by comparison of retention times and mass spectra with those of standards and quantified (calibration with external standards) by GC-EIMS. For low concentrations, or in the case of co-elutions, quantification was achieved using selected ion monitoring (SIM). The main characteristic mass fragment ions used to quantify degradation products of sterols were previously described (Christodoulou *et al.*, 2009; Rontani *et al.*, 2009b). GC-EIMS analyses were carried out with an Agilent 6890 gas chromatograph connected to an Agilent 5973 Inert mass spectrometer. The following conditions were employed: 30 m x 0.25 mm (i.d.) fused silica capillary column coated with SOLGEL-1 (SGE; 0.25 μ m film thickness); oven temperature programmed from 70°C to 130°C at 20°C min⁻¹, from 130°C to 250°C at 5°C min⁻¹ and then from 250°C to 300°C at 3°C min⁻¹; carrier gas (He) maintained at 0.69 bar until the end of the temperature program and then programmed from 0.69 bar to 1.49 bar at 0.04 bar min⁻¹; injector (splitless) temperature, 250°C; injector (on column) temperature, 50°C; electron energy, 70 eV; source temperature, 170°C; cycle time, 1.5 s. An on-column injector was used for the analysis of sterol degradation products and alkenones and a splitless injector for the analysis of fatty acid and phytol degradation products.

Standard oxidation products of oleic and vaccenic acids, chlorophyll phytol side-chain and sterols were obtained according to previously described procedures (Rontani & Marchand, 2000; Marchand & Rontani, 2001; Rontani *et al.*, 2003b).

3. Results and discussion

Particulate organic matter in euphotic zone suspended particles from the EqPac was dominated by chemical signatures indicative of phytoplankton (Wakeham *et al.*, 1997a; Sheridan *et al.*, 2002), which at the time of sampling were composed of prochlorophytes, cyanobacteria, prymnesiophytes, dinoflagellates and diatoms (Kaczmarek & Fryxell, 1995; Landry *et al.*, 1996). In contrast, sinking particles collected at the base of the euphotic zone (105 m depth) contained a mixture of lipids derived from phytoplankton (mainly diatoms), zooplankton fecal pellets, foraminifera and small copepods (Wakeham *et al.*, 1997a). Overall, suspended particles in the upper 200 m were more similar in their organic composition to surface ocean phytoplankton and were less degraded than sinking particles collected in the 105 m trap. Labile phytodetrital material was still detected in midwater (200-1000 m) suspended particles, even though it was probable that algal lipids were being increasingly degraded heterotrophically by bacteria and/or consumed by zooplankton with depth. Notably, in the present context, neither the Wakeham *et al.* (1997 a,b) nor the Sheridan *et al.* (2002) studies included any discussion of abiotic degradation.

Our goal here was to better understand unexpected abundances of labile OM at depth in the EqPac. To evaluate potential effects of abiotic degradation as a complement to the more commonly studied biologically-mediated processes, we measured a suite of lipid oxidation products as tracers of both biotic and abiotic processes (Fig.VI-1; Rontani, 2008, and references therein). These tracers convey two important pieces of information. First, they help discern the mechanisms of degradation, whether biological or abiological, and if the later, whether photooxidative or autoxidative. Second, they may provide some information on the OM source. Thus we consider two groups of tracers. The first set of oxidation products confirms that OM is in fact being degraded and may help elucidate the mechanism of degradation, but they are non-specific as to OM source since the precursors derive from a wide range of biological sources. For example, degradation products of the phytyl side-chain of chlorophyll or oleic acid help to distinguish between photodegradation and autoxidation (Fig.VI-1) but do not provide any biological source information for the precursor lipid since all algae contain chlorophyll and both phytoplankton and zooplankton contain oleic acid. The second group of oxidation products derive from source-specific lipids, such as *cis*-vaccenic acid common in and relatively unique to bacteria, phytosterols which carry some degree of

specificity for algal type, and epoxyalkenones that are produced during bacterial degradation of haptophyte-derived long-chain alkenones. This second category of tracers also conveys useful information about the degradation state of specific organisms, usually when abundances are compared to the undegraded precursors. In the following sections, we describe four case studies examining distributions of degradation products in the EqPac as a means for elucidating the mechanisms by which lipids classes are degraded in the ocean.

3.1. Case 1: Chlorophyll

The chloropigment content of the surface and midwater suspended particle samples investigated in the present work was previously examined by Sheridan *et al.* (2002). Chlorophyll-a was dominant, whereas pheopigments were not detected. Despite the increasing contribution of fragments of sinking zooplankton feces or midwater microzooplankton previously observed with depth (Sheridan *et al.*, 2002), zooplanktonic grazing did not play a significant role in the degradation of chlorophyll in these suspended samples. In contrast, high proportions of pheophorbides, pheophytins and pyropheophorbides (ratios of total pheopigments/chlorophyll ranging from 0.8 to 8.9) were present in sinking particles collected at 105, 955 and 3459 m (Lee *et al.*, 2000). The presence of these degradation compounds attested to the importance of macrozooplankton grazing (Shuman & Lorenzen, 1975) in the transformation of chlorophyll in sinking particles.

Although the visible light-dependent degradation rate of the chlorophyll tetrapyrrole ring is three to four times higher than for its phytyl side-chain (Cuny *et al.*, 1999), no specific and stable tetrapyrrole photodegradation products have been identified. Type II photosensitized oxidation (i.e. involving singlet oxygen) of the phytyl side-chain, however, leads to the production of 2-hydroperoxy-3-methylidene-7,11,15-trimethylhexadecan-1-ol (Fig.VI-1) which after NaBH₄-reduction can be quantified as 3-methylidene-7,11,15-trimethylhexadecan-1,2-diol (phytyldiol). Phytyldiol is ubiquitous in the marine environment and has been proposed as tracer for photodegradation of chlorophyll’s phytyl side chain (Rontani *et al.*, 1994; 1996; Cuny & Rontani, 1999). Further, the molar ratio phytyldiol/phytol (CPPI: Chlorophyll Phytyl side-chain Photodegradation Index) can be used to estimate the extent of chlorophyll photodegraded in natural marine samples by an empirical equation: chlorophyll photodegradation % = $(1 - (\text{CPPI} + 1)^{-18.5}) \times 100$ (Cuny *et al.*, 2002).

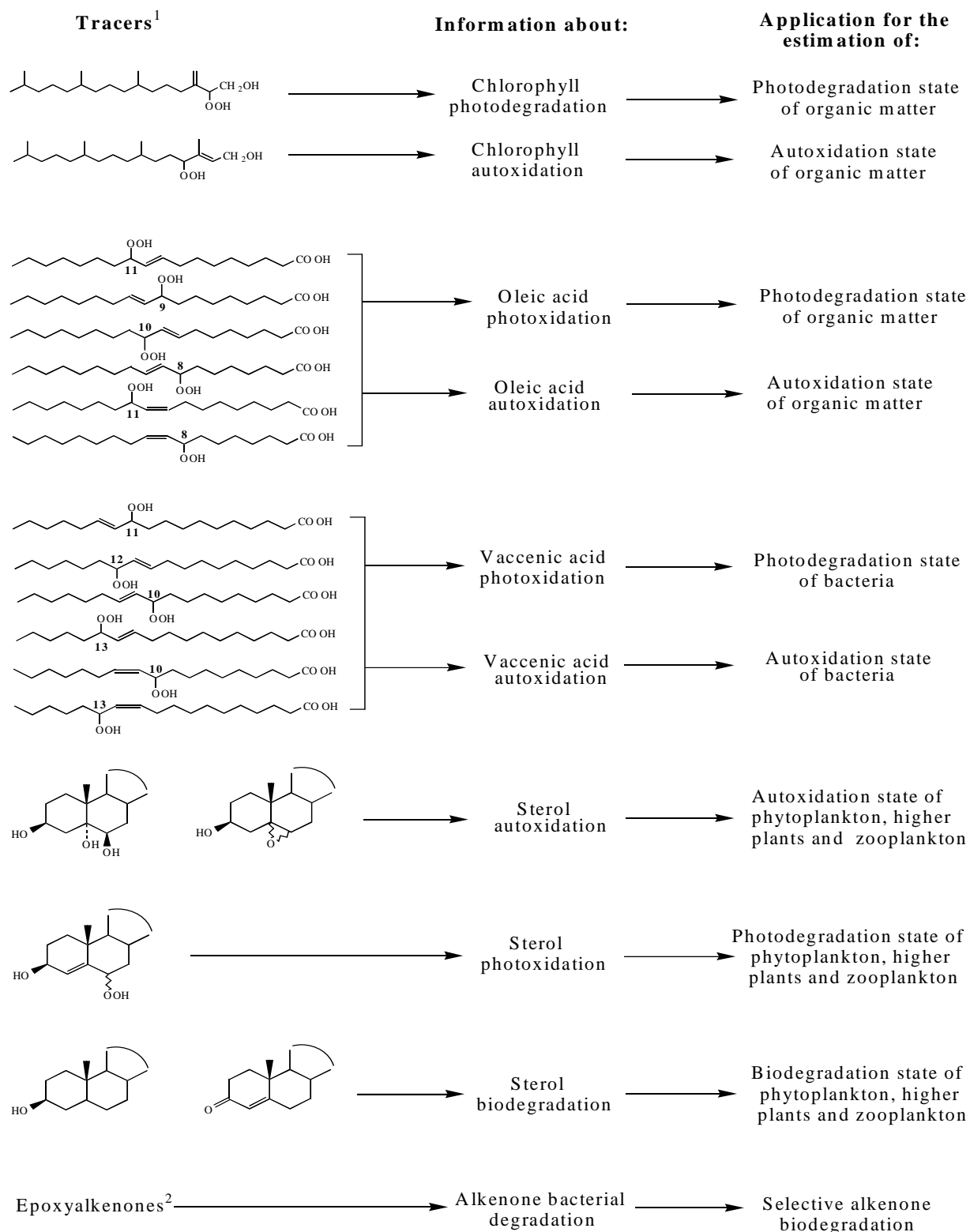


Fig. VI-1. Formulae and potential applications of the different lipid tracers of degradation processes employed in the present work.

¹Hydroperoxides were quantified after NaBH₄-reduction to the corresponding alcohols.

²The structures of epoxyalkenones are given in figure VI-6.

Quantification of phytol and phytyldiol thus allowed us to determine chlorophyll photooxidation percentages in the EqPac samples (Fig.VI-2A). We estimate that nearly 90% of residual chlorophyll in sinking particles – that fraction of algal chlorophyll which has survived biodegradation during zooplankton grazing – is photodegraded, despite high sinking rates that yield short residence times of sinking particles within the euphotic layer (<1 day for settling velocities of >100 m/d). Comparably high levels of photooxidation of chlorophyll in sinking particles were also observed in the Ligurian Sea (Cuny *et al.*, 2002). Thus, most of the residual chlorophyll sinking out of the euphotic zone appears to be photodegraded, and this degradation must occur quickly as the particles do not spend much time in the sunlit surface waters. Chlorophyll photodegradation percentages in near-surface suspended particles (15-150 m) were lower, close to 20% (Fig.VI-2A), possibly because phytoplankton growth continually renewed the chlorophyll standing stock in surface waters. Midwater suspended particles (250-840 m) appeared to be more strongly photodegraded (up to 80%). It is tempting to speculate that sinking particles with high amounts of phytyldiol disaggregate at depth to increase the abundance of phytyldiol in deep suspended particles.

Free radical oxidation (autoxidation) of the chlorophyll phytyl side-chain affords different degradation products (Rontani, 2008). Among these compounds, we selected (*Z* and *E*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecan-2-ene-1,4-diols (obtained after NaBH₄-reduction of the corresponding hydroperoxide) (Fig.VI-1) as indicators of radical-mediated autoxidation of chlorophyll (Rontani & Aubert, 2005). In both suspended and sinking particles investigated here, the percentage of autoxidation products (relative to intact phytol; Fig.VI-2B) generally follows the increasing-with-depth trends of chlorophyll photooxidation. At first glance, it would appear that the suspended particle pool might be more affected by autoxidation than the sinking particles, probably due to longer residence times of suspended particles in the water column. However it is difficult to derive a robust comparison of photooxidation *vs.* autoxidation based on the 3,7,11,15-tetramethylhexadecan-2-ene-1,4-diols since these are but a few of the many products of autoxidation of phytol. In this regard, the monounsaturated fatty acids discussed in the next section may be more useful.

The degradation of residual chlorophyll thus appears to be mainly induced by abiotic processes (photooxidation and autoxidation) in suspended particles, while both biotic (during zooplankton grazing, not explicitly discussed here) and abiotic processes play a role in its degradation in sinking particles.

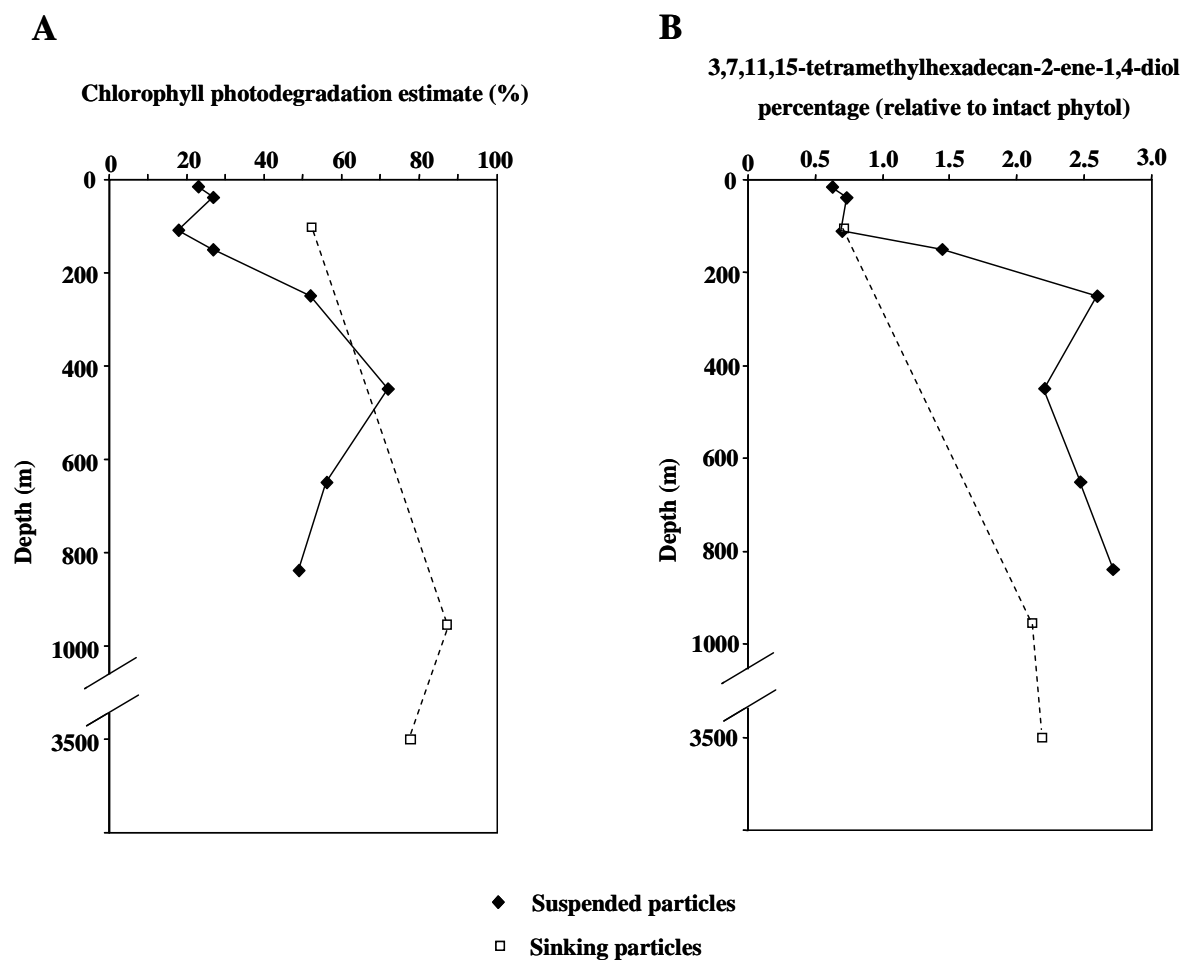


Fig. VI-2. CPPI-derived chlorophyll photodegradation estimates (A) and 3,7,11,15-tetramethylhexadecan-2-ene-1,4-diol percentage (relative to intact phytol) (B) in the different suspended and sinking particle samples investigated.

3.2. Case 2: Monounsaturated fatty acids

Autoxidation and photooxidation of monounsaturated fatty acids lead to the formation of oxidation products stable enough in the marine environment to act as distinguishing markers (Rontani, 2001; 2008). Singlet oxygen-mediated photooxidation of monounsaturated fatty acids involves a direct reaction of $^1\text{O}_2$ with the carbon-carbon double bond by a concerted “ene” addition (Frimer, 1979) and leads to formation of hydroperoxides at each carbon of the original double bond. Thus, photooxidation of oleic acid produces a mixture of 9- and 10-hydroperoxides with an allylic *trans*-double bond (Frankel *et al.*, 1979), which can subsequently undergo highly stereoselective radical allylic rearrangement to 11-*trans* and 8-*trans* hydroperoxides, respectively (Porter *et al.*, 1995; Fig.VI-1). Similarly, *cis*-vaccenic acid produces a mixture of 11- and 12-hydroperoxides with an allylic *trans* double bond

(Marchand & Rontani, 2001), both of which can also undergo radical allylic rearrangement to 13-*trans* and 10-*trans* hydroperoxides (Fig.VI-1). In contrast, free radical oxidation of monounsaturated fatty acids produces six isomeric hydroperoxyacids. Autoxidation of oleic acid yields 9-*trans*, 10-*trans*, 11-*trans*, 11-*cis*, 8-*trans* and 8-*cis* hydroperoxides (Frankel, 1998) and *cis*-vaccenic acid yields 10-*trans*, 10-*cis*, 11-*trans*, 12-*trans*, 13-*trans*, and 13-*cis* hydroperoxides (Marchand & Rontani, 2001; Fig.VI-1). Thus free radical-mediated oxidation processes can be easily discerned by the *cis* allylic hydroperoxyacids. With these differences in mind, we quantified the products of both autoxidation and photooxidation of oleic and *cis*-vaccenic acid (after NaBH₄-reduction to the corresponding hydroxyacids) in our EqPac samples.

Because oleic acid has diverse biological sources, we can use abundances of its oxidation products to assess abiotic degradation of bulk OM. Photooxidation state, measured as ratios of the sum of 8-*trans*, 9-*trans*, 10-*trans* and 11-*trans*-hydroxyacids to oleic acid (after subtraction of the amounts of these compounds arising from autoxidation processes) in suspended and sinking particles are shown in figure VI-3A. Photodegradation products of oleic acid in suspended POM were most abundant (20% of residual oleic acid) at 250 m vs. 450 m for chlorophyll (Fig 2A). For the sinking particles, the highest photooxidation state was for the 955 m sample (Fig.VI-3A), similar to but less extensive than for chlorophyll. To evaluate autoxidation, we need to calculate the amounts of 8-*trans*, 9-*trans*, 10-*trans* and 11-*trans*-hydroxyacids according to the proportions of 8-*cis* and 11-*cis*-hydroxyacids detected (Frankel, 1998; Marchand & Rontani, 2001) and the ambient seawater temperature (ranging from 25 to 10°C between 15 and 400 m in the EqPac, respectively; USJGOFS EqPac database, cruise TT011, e.g., <http://usjgofs.whoi.edu/jg/dir/jgofs/eqpac/tt011>, event 08291203, sta 8, CDT cast 095):

$$([8-cis] + [11-cis])/[9-trans] = -0.0138T + 1.502 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$([8-cis] + [11-cis])/[10-trans] = -0.0144T + 1.553 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$[8-cis]/([8-cis] + [8-trans]) = -0.0055T + 0.627 \quad \text{Eq. (3)}$$

$$[11-cis]/([11-cis] + [11-trans]) = -0.0058T + 0.635 \quad \text{Eq. (4)}$$

Results of this comparison are shown in figure VI-3B. Autoxidation therefore appears to play a less important role in the water column degradation of oleic acid than photooxidation, reaching only about 12% and 6% of residual oleic acid (ratios of the sum of measured 8-*cis*, 11-*cis* and calculated (Eq. 1-4) 8-*trans*, 9-*trans*, 10-*trans* and 11-*trans* autoxidative hydroxyacids to oleic acid) for suspended and sinking particles, respectively.

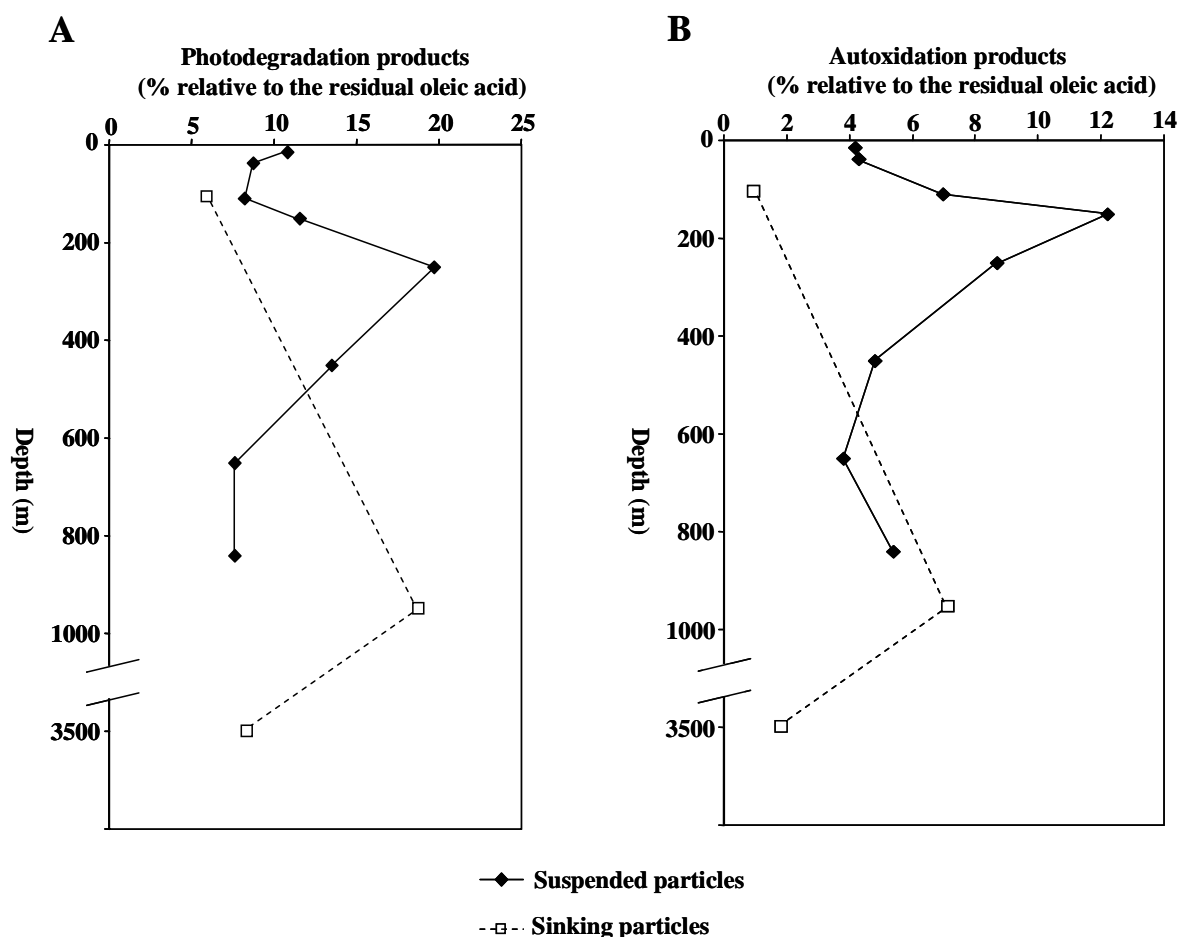


Fig. VI-3. Oleic acid photooxidation (A) and autoxidation (B) percentages in the different suspended and sinking particle samples investigated. These values were calculated from 8-hydroxyoctadec-9(*cis*)-enoic, 8-hydroxyoctadec-9(*trans*)-enoic, 11-hydroxyoctadec-9(*cis*)-enoic, 11-hydroxyoctadec-9(*trans*)-enoic, 9-hydroxyoctadec-10(*trans*)-enoic and 10-hydroxyoctadec-8(*trans*)-enoic acid concentrations as indicated in the text.

The greatest effect of autoxidation of oleic acid was observed at 150 m for the suspended particles. The percentage of both photooxidation and autoxidation products of oleic acid decreased more quickly with depth than did chlorophyll degradation products. This difference could be attributed to: (i) more extensive degradation of linear oleic acid oxidation products relative to the chlorophyll-derived isoprenoidal phytol side-chain, or (ii) a dilution of the signal by “fresh” oleic acid derived from undegraded plankton that might also be present in

the POM sample. Autoxidation of suspended POM showed a slightly different depth profile from that of photooxidation, peaking at 150 m vs. 250 m for photooxidation (Fig. VI-3B). Overall, our results would imply that photodegradation appears to be more important than autoxidation for both suspended and sinking POM in the equatorial Pacific.

Cis-vaccenic acid, on the other hand, is commonly considered a specific bacterial indicator (e.g., Sicre *et al.*, 1988). The results of the quantification of the unique *cis-vaccenic acid* photooxidation products (ratios of the sum of 10-*trans*, 11-*trans*, 12-*trans* and 13-*trans*-hydroxyacids to *cis-vaccenic acid* after subtraction of the amounts of these compounds arising from autoxidation) and autoxidation products (ratios of the sum of measured 10-*cis*, 13-*cis* and calculated (Eq. 1-4) 10-*trans*, 11-*trans*, 12-*trans* and 13-*trans* hydroxyacid autoxidation products to residual vaccenic acid) are summarized in figure VI-4.

Accordingly, neither photooxidation nor autoxidation had much effect on *cis-vaccenic acid* in sinking particles. In contrast, *cis-vaccenic acid* was significantly photodegraded in the suspended particles exiting the photic zone (collected at 110 m; Fig. VI-4A) and strongly autoxidized in suspended particles collected below the photic zone between 110 and 250 m (Fig. VI-4B). Combined, total oxidation product (autoxidation + photooxidation) percentages (relative to the residual vaccenic acid) ranged from 11 to 30% in suspended POM, maximizing at 100 m. We interpret these results as suggesting that bacterial OM associated with the suspended particles exiting the photic zone is strongly degraded abiotically by both photooxidation and autoxidation.

Since photooxidation of *cis-vaccenic acid* appears to be important in the euphotic zone of the EqPac, we suggest that singlet oxygen is efficiently transferred from phyto-detritus, where it is produced by excitation of chlorophyll, to the heterotrophic bacteria (and their lipids) that are associated with the detritus. This transfer has been observed previously *in vitro* (Rontani *et al.*, 2003a; Christodoulou *et al.*, 2010), and it thus may also be important in the EqPac. In heterotrophic bacteria, photochemical damage induced by singlet oxygen could be enhanced due to the lack of an adapted photoprotective system in these microorganisms (Garcia-Pichel, 1994). In EqPac suspended particles, *cis-vaccenic acid* also appeared to be particularly sensitive towards autoxidation (Fig. VI-4B). Indeed, reaction of singlet oxygen with unsaturated components of the outer lipopolysaccharide membrane of Gram negative bacteria – the dominant bacteria in the ocean – leads to the formation of reactive secondary products, such as peroxy radicals, which may in turn accentuate the cell death (Dahl *et al.*, 1989).

Consequently, both autoxidation and photooxidation appear to be strongly favoured in the abiotic degradation of bacterial OM.

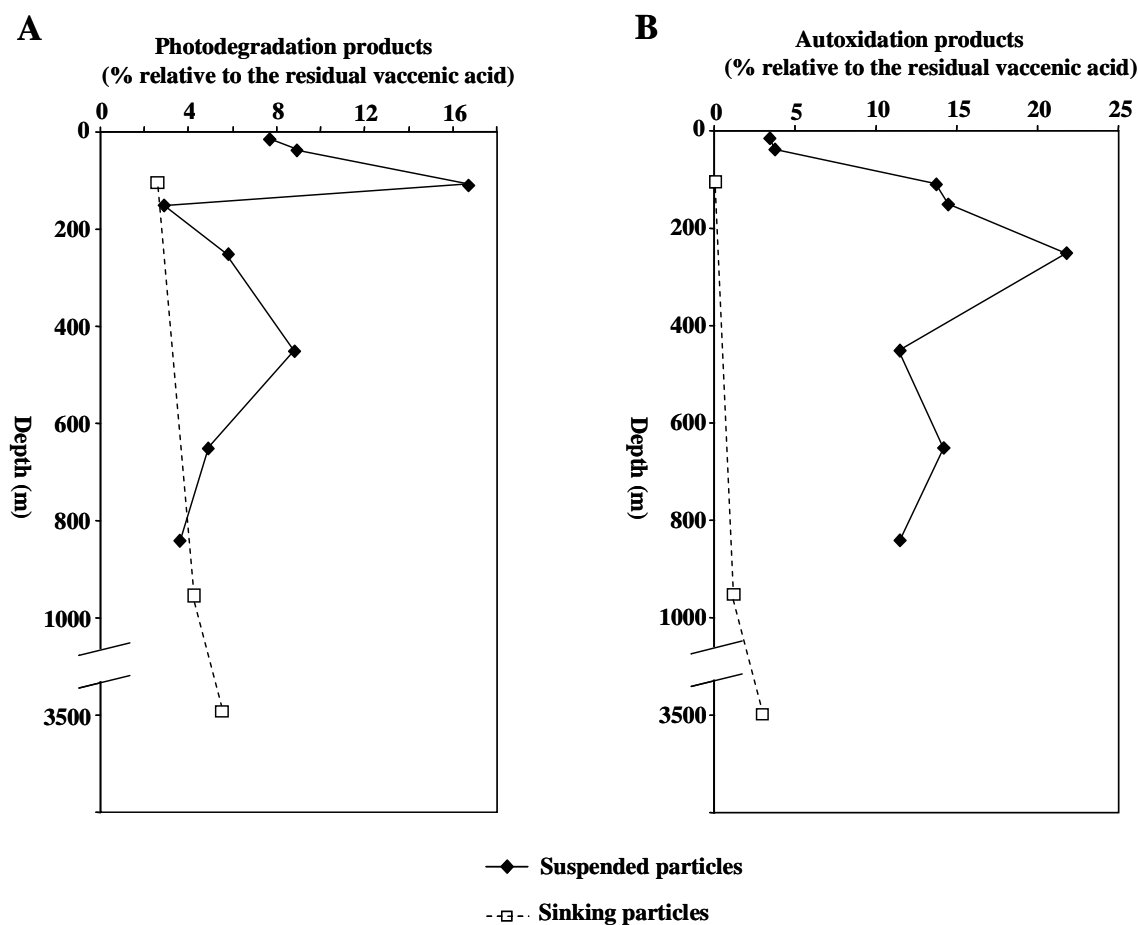


Fig. VI-4. *Cis*-vaccenic acid photooxidation (A) and autoxidation (B) percentages in the different suspended and sinking particle samples investigated. These values were calculated from 10-hydroxyoctadec-11(*cis*)-enoic, 10-hydroxyoctadec-11(*trans*)-enoic, 13-hydroxyoctadec-11(*cis*)-enoic, 13-hydroxyoctadec-11(*trans*)-enoic, 11-hydroxyoctadec-12(*trans*)-enoic and 12-hydroxyoctadec-10(*trans*)-enoic acid concentrations as indicated in the text.

The results described here further suggest that transfer of singlet oxygen from phytodetritus to attached bacteria is apparently more efficient for suspended particles than for sinking particles. The lifetime of singlet oxygen in apolar environments is longer, and its potential diffusive distance greater, than under polar conditions (Suwa *et al.*, 1977). Taking into account the abundance of diatoms (and diatom lipids) in the EqPac sinking POM (Wakeham *et al.*, 1997a) and the high sinking rates of aggregated diatoms (Ravens & Waite, 2004), we attribute the poor oxidation state of *cis*-vaccenic acid in sinking particles to the presence of

abundant silica-rich particles, whose charged mineral surfaces reduce the lifetime of $^1\text{O}_2$ and inhibit its migration to *cis*-vaccenic acid-containing bacterial biomass.

Transfer of $^1\text{O}_2$ from photolysed senescent phytoplanktonic cells to attached bacteria significantly inhibits bacterial growth in experiments with *Emiliana huxleyi* (J.-F. Rontani, unpubl.). The strong autoxidative and photooxidative degradation of *cis*-vaccenic acid we observed in particles exported from the photic zone at EqPac indicates that bacteria are strongly degraded abiotically and that bacterial growth on these particles may be limited by the consequences of singlet oxygen transfer. In contrast, in sinking particles the weak degradation state of *cis*-vaccenic acid implies that bacteria are in good physiological state due to inhibited singlet oxygen transfer and that biodegradation may be more important. These results can thus explain why surface suspended particles (0-200 m) previously appeared to be less degraded than particles sinking out of the euphotic zone (105 m; Sheridan *et al.*, 2002).

3.3. Case 3: Δ^5 -Stenols

We further tested the relative importance of biodegradation, photooxidation, and autooxidation for different components of POM by quantifying degradation products of three “model” Δ^5 -stenols. Although cholest-5-en-3 β -ol, 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, and 24-ethylcholesta-5-en-3 β -ol have similar molecular structures, we show below that they may have different fates with respect to degradation.

Aerobic bacteria may completely remineralize Δ^5 -stenols (Owen *et al.*, 1983; Naghibi *et al.*, 2002), or they may sequentially convert Δ^5 -stenols to ster-4-en-3-ones, 5 α (H)-stan-3-ones and 5 α (H)-stanols in marine POM (Gagosian *et al.*, 1982b; de Leeuw & Baas, 1986; Wakeham, 1989). These steroid ketones and stanols thus constitute useful indicators of bacterial degradation of stenols and hence we measured them in our EqPac samples after NaBH_4 reduction and alkaline hydrolysis. During this treatment, ster-4-en-3-ones and 5 α (H)-stanones were converted to ster-4-en-3-ols and 5 α (H)-stanols, respectively.

Free radical autoxidation of Δ^5 -stenols yields mainly 7 α - and 7 β -hydroperoxides and, to a lesser extent, 5 α / β ,6 α / β -epoxysterols and 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxysterols (Smith, 1981). Here, we selected 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxysterols as tracers of sterol autoxidation. 7-Hydroperoxides were discarded on the basis of their lack of specificity and their instability (Christodoulou *et al.*, 2009) and 5 α / β ,6 α / β -epoxysterols could not be used since they are converted to the corresponding triol during the saponification step we used.

Singlet-oxygen mediated photooxidation (type II photoreactions) of Δ^5 -sterols produces mainly Δ^6 -5 α -hydroperoxides with low amounts of Δ^4 -6 α /6 β -hydroperoxides (Nickon & Bagli, 1961; Kulig & Smith, 1973). Δ^4 -6 α /6 β -hydroperoxides were selected as tracers of photooxidation of Δ^5 -sterols due to their high specificity and relative stability (Christodoulou *et al.*, 2009; Rontani *et al.*, 2009b). These compounds were quantified after NaBH₄ reduction to the corresponding diols and the sterol photooxidation percentage was estimated with the following equation (Christodoulou *et al.*, 2009; Rontani *et al.*, 2009b): Sterol photooxidation % = (Δ^4 -3 β ,6 α / β -dihydroxysterol %) * (1+0.3)/0.3, based on the ratio Δ^4 -6 α /6 β -hydroperoxides/ Δ^6 -5 α -hydroperoxides measured in biological membranes (0.30, Korytowski *et al.*, 2001).

Use of this suite of tracers to estimate the relative importance of the three degradation processes on the parent Δ^5 -sterols requires that the removal rates by further degradation of each set degradation products are similar. Although all of the degradation products may also be totally mineralized by marine bacteria, we also assume that they exhibit similar reactivities towards biotic degradation. This assumption is based on the fact that aerobic biodegradation of sterols generally involves initial terminal attack of the side chain, which will be similar for all three model Δ^5 -sterols we have selected. The results of the quantification of these degradation products of Δ^5 -sterols are summarized in figure VI- 5A-C.

Although photooxidation of chlorophyll and oleic acid appeared to be significant in the suspended and sinking EqPac particles, photooxidation of Δ^5 -sterols, as indicated by photooxidation product ratios ranging from 0.1 to 14% for cholest-5-en-3 β -ol, 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, and 24-ethylcholesta-5-en-3 β -ol, appears less important than either bacterial degradation or autoxidation, although there is variation among the sterols and between particle classes. Type II photooxidation of Δ^5 -sterols is generally characterized by lower degradation rate constants than for chlorophyll and monounsaturated fatty acids (Rontani *et al.*, 1998), possibly be due to steric hindrance during the attack of the sterol Δ^5 double bond by singlet oxygen (Beutner *et al.*, 2000). In contrast, sterol photodegradation product percentages for suspended POM in the Ligurian Sea were much higher, ranging between 50 and 120% of the residual cholest-5-en-3 β -ol and 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol, respectively (Rontani *et al.*, 2009b), than for EqPac suspended POM. Photodegradation seems thus to play a greater role in the degradation of POM in Ligurian Sea than in the Equatorial Pacific Ocean.

24-Methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol is a major sterol in many phytoplankton (especially diatoms). The percentage of biotic degradation products of 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, although higher than for either photooxidation or autoxidation, was relatively low (~14%) and constant with depth in suspended particles, but not in sinking particles where it increased strongly (up to 35%, Fig.VI-5A). These results suggest that 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, and by analogy slowly sinking phytodetritus, may be better preserved against biodegradation in suspended particles than in sinking particles. This enhanced preservation of suspended POM might result from inhibition of bacterial growth if singlet oxygen generated by extensive photolysis of phytodetritus in the euphotic zone is efficiently transferred to attached bacteria, as we proposed above for *cis*-vaccenic acid. On the other hand, we suggest that abundant silica tests in the sinking particle pool reduces the efficiency of $^1\text{O}_2$ transfer to bacteria allowing greater bacterial growth and hence greater biodegradation of 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol in sinking particles than in suspended particles.

In contrast, 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol appeared to be less biodegraded than 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol (Fig.VI-5B), especially in suspended particles and the deepest sinking particles, despite the fact that most of the 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol may also derive from phytoplankton. Likewise, photodegradation of 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol appeared to be low, but autoxidation, especially in the suspended and the deepest sinking POM, appeared high. That there are differences between the overall behaviors of 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol and 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol suggests that their sources might be uncoupled. In addition to phytoplankton sources (Volkman, 1986; 2003), which ^{13}C isotope analyses (Wakeham *et al.*, 1997a) suggest dominate the EqPac samples, 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol also derives from vascular plants. Autoxidation of terrestrial OM can be intense and plays an important role during degradation of vascular plant sterols (J.-F. Rontani unpubl.). The strong autoxidation state of 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol in suspended EqPac particles suggests a significant atmospheric contribution of terrigenous OM and autoxidized 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol, even to these remote ocean samples. Products of autoxidation of 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol have been detected in atmospheric aerosols collected above the Mediterranean Sea (J.-F. Rontani unpubl.), and extensive work by the SEAREX (Sea-Air Exchange) program has documented long-range atmospheric transport of vascular plant biomarkers and their oxidation products, to remote regions of the Pacific Ocean (Gagosian *et al.*, 1981; Gagosian & Peltzer, 1986; Peltzer & Gagosian, 1989).

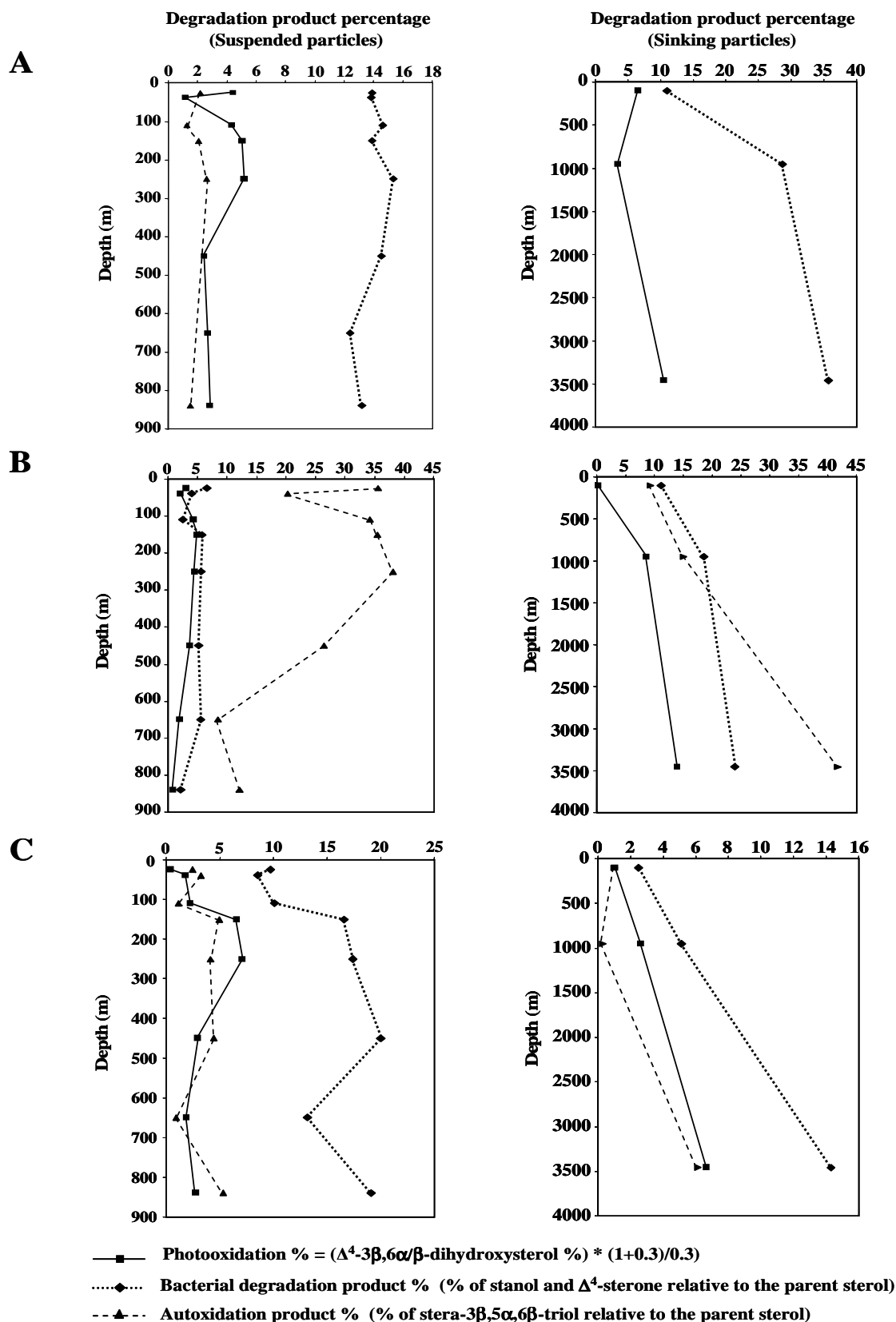


Fig. VI- 5. 24-Methylcholesta-5,22-dien- 3β -ol (A), 24-ethylcholest-5-en- 3β -ol (B) and cholest-5-en- 3β -ol (C) degradation product percentages in the different suspended and sinking particle samples investigated. (24-methylcholest-22-en- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol could not be detected in sinking particles).

Furthermore, any 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol associated with waxy vascular plant debris might be physically protected from enzymatic attack (Hedges & Keil, 1995; Hedges *et al.*, 2001) whereas algal 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol is not. It is interesting that the deepest sinking POM sample (at 3469 m) showed the highest apparent autoxidation of 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol. We speculate that this sample might contain the highest abundance of autoxidized terrestrial OM, whereas the shallower and less autoxidized sinking POM (at 105 and 955 m) are dominated by phytoplankton-derived 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol which has experienced less autoxidation, similar to the shallow suspended pool. If the autoxidized 24-ethylcholest-5-en-3 β -ol does indeed reflect a terrestrial origin, that this may help account for selective enrichments of terrestrial biomarkers in Pacific aerosols, water column POM, and sediments (Zafiriou *et al.*, 1985; Wakeham *et al.*, 1997a,b); indeed, Zafiriou *et al.* (1985) estimated that 15-34% of C_{org} in sediments of equatorial Pacific had a terrestrial origin.

One might expect that cholest-5-en-3 β -ol would behave similarly to 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol since both have largely marine origins. However, the two sterols appear to behave somewhat differently, with the proportion of biodegradation products of cholest-5-en-3 β -ol increasing with depth for suspended particles (Fig.VI-5C; versus relatively uniform percentage of degradation products for 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol; Fig.VI-5A). Part of this difference might arise via a transfer of cholesterol biodegradation products from the sinking POM, where cholesterol dominated the sterol distribution, presumably reflecting a major contribution from cholesterol-rich zooplankton fecal pellets (Wakeham *et al.*, 1997a) to the suspended particle pool via disaggregation. Numerous studies have shown zooplankton as major biodegraders of POM, and steroid ketone- and stanol-enriched in zooplankton fecal pellets have been implicated as sources of sterol biodegradation products in marine POM, but with differing distributions between sinking and suspended particle pools (Wakeham & Canuel, 1986; Wakeham, 1987; and references therein).

3.4. Case 4: Alkenones and alteration of $U_{37}^{K'}$

The validity of the widely-used alkenone thermometer (Herbert, 2003) requires that abundances of the C_{37:3} and C_{37:2} alkenones and the derived $U_{37}^{K'}$ unsaturation index ($U_{37}^{K'} = [\text{MeC}_{37:2}] / ([\text{MeC}_{37:2}] + [\text{MeC}_{37:3}])$) depend only on the temperature at which the source haptophytes (e.g., *Emiliania huxleyi* and/or *Gephyrocapsa oceanica*) are growing. During

development of the alkenone paleothermometer, diagenesis (in both the water column and sediments) was discounted as altering $U_{37}^{K'}$ (e.g., Prahl *et al.*, 1989a; Teece *et al.*, 1998). However, it is now well established that alkenones are indeed sensitive to degradation during transport through the water column (as measured by decreasing POM fluxes) or in sediments (decreasing sediment concentrations) (e.g., Gong & Hollander, 1999; Wakeham *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009); only about 1/3 of the alkenones exported out of the euphotic zone in the EqPac survive transport to depth (i.e., 105 m flux of $C_{37:2}$ was about 3x the 3459 m flux). Furthermore, laboratory experiments with degrading *E. huxleyi* cells (Rontani *et al.*, 2006b, 2008; Prahl *et al.*, 2010) and field measurements of marine POM (Rontani *et al.*, 2008; Rontani & Wakeham, 2009) show that $C_{37:3}$ is more susceptible to degradation by both aerobic bacteria and autoxidation than $C_{37:2}$, thus altering $U_{37}^{K'}$ values and producing a false “warming” beyond that expected from seasonal temperature and production/export effects. We now evaluate the potential for artifacts that degradation might have on particulate alkenone $U_{37}^{K'}$ values in the equatorial Pacific and subsequent paleoclimatic reconstructions.

Alkenones were quantified indirectly as the corresponding silylated alkenols after NaBH_4 -reduction and subsequent silylation. Mass spectra of the trimethylsilyl ethers are dominated by specific fragment ions at m/z 117 (in the case of methyl alkenols) and m/z 131 (in the case of ethyl alkenols; Rontani *et al.*, 2001) allowing quantification of silylated alkenols in SIM (Selected Ion Monitoring) mode. This technique is particularly useful for quantifying precisely small amounts of $C_{37:3}$ in the presence of large amounts of $C_{37:2}$ alkenone (Fig.VI-6). $U_{37}^{K'}$ values thus obtained are summarized in Table VI-1.

In EqPac sediment trap material, $U_{37}^{K'}$ increased with depth from 0.90 to 0.97 (Table VI-1) consistent with surface and mixed layer temperatures in the EqPac over the time period of our sampling (~26–28 °C; Kessler & McFadden, 1995). Sediment trap material from farther east in the equatorial Pacific (0°N, 175°E) had similar $U_{37}^{K'}$ values (0.92–1.0) (Harada *et al.*, 2001). $U_{37}^{K'}$ values in suspended EqPac particles varied somewhat (0.76–0.91, Table VI-1) but generally did not change in any consistent trend with depth. $U_{37}^{K'}$ values for surface water suspended POM are approximately the same as the 105 m deep trap material and probably represent the same alkenone source. Higher $U_{37}^{K'}$ values in the deep sediment traps could

mean that alkenones in these time-integrated samples were biosynthesized under warmer surface waters conditions, or that degradation has altered the $U_{37}^{K'}$ values.

Table VI-1. $U_{37}^{K'}$ values measured in suspended and sinking particles collected in equatorial Pacific Ocean

Depth (m)	$U_{37}^{K'}$ suspended particles	$U_{37}^{K'}$ sinking particles
15	0.91	
39	0.89	
105		0.90
110	0.83	
150	0.92	
250	0.89	
450	- ^a	
650	0.76	
840	0.85	
955		0.95
3459		0.97

^a Data not obtained ($C_{37:3}$ alkenone concentration too low to be precisely measured)

We suspect that the increase in $U_{37}^{K'}$ values with increasing depth that we observe in the EqPac sediment trap samples can be attributed to preferential biodegradation, during particle sinking, of the more highly-unsaturated $C_{37:3}$. Two distinct metabolic pathways apparently are possible: attack on the terminal groups of the molecule that leads to non-selective degradation (of both compounds equally) or attack on alkenone double bonds leading to preferential degradation of the more unsaturated compound. In order to check such a possibility, we searched for the presence of epoxide derivatives of alkenones in the sinking particle samples. Epoxyalkenones are generated by aerobic bacterial oxidation of alkenone double bonds (Rontani *et al.*, 2008; Prahl *et al.*, 2010) and have been found previously in marine POM and sediments (Black Sea: Rontani & Wakeham, 2008; northwestern North Pacific: Prahl *et al.*, 2010; Peru: J.-F. Rontani unpubl.). GC-EIMS analyses of the silylated $NaBH_4$ -reduced lipid extracts (Rontani *et al.*, 2001) of our EqPac samples allowed us to detect isomeric $C_{37:1}$ and $C_{37:2}$ diols (arising from the reduction of the corresponding époxyalcénones; Fig.VI-6), confirming the presence of bacteria able to attack alkenone double

bonds in the EqPac sinking particles. Although a precise quantification of isomeric $C_{37:2}$ diols resulting from the reduction of the epoxides of $C_{37:3}$ alkenone was very hard due to the very low amounts of the parent alkenone in the samples, the ratio of $C_{37:2}/C_{37:1}$ isomeric diols could be estimated to 0.2 in the trap collected at 955 m, while the ratio $[C_{37:3}]/[C_{37:2}]$ was close to 0.05 ($U_{37}^{K'} = 0.95$; Table VI-1). The increased $U_{37}^{K'}$ values we observed in the deep sediment trap samples (+0.07 equivalent to an inferred “warming” of +2°C) could thus be attributed to selective bacterial degradation.

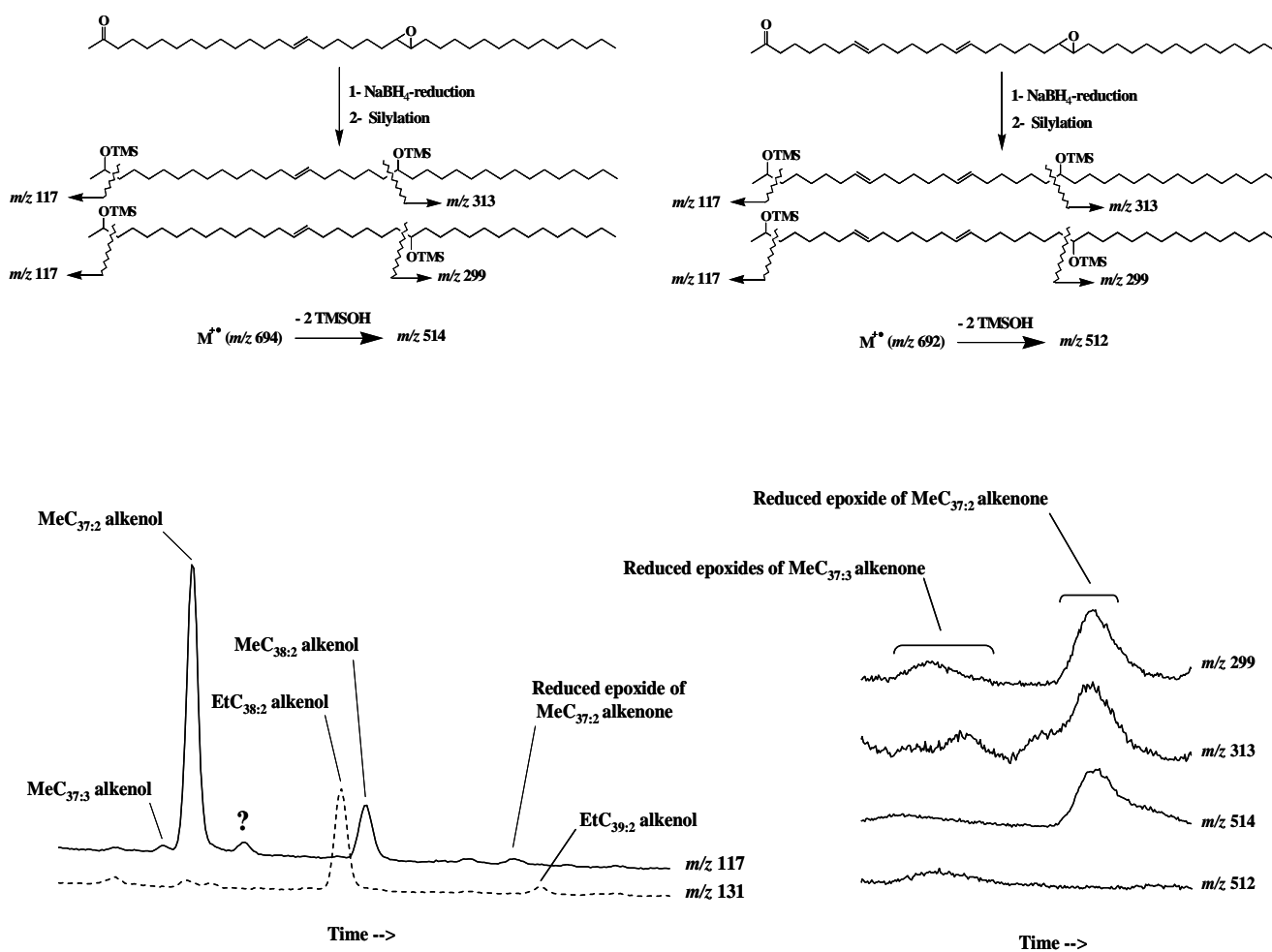


Fig. VI-6. Partial m/z 117, 131, 299, 313, 512 and 514 mass chromatograms of the total lipid extract obtained from the sinking particle sample collected at 955 m showing the presence of a diol resulting from $NaBH_4$ -reduction and silylation of $C_{37:2}$ and $C_{37:3}$ alkenone-derived epoxide. For simplification only one isomeric epoxyalkenone was represented.

Preferential loss of $C_{37:3}$ by autoxidation also alters the $U_{37}^{K'}$ index (Rontani *et al.*, 2006b; 2007b), and this process is believed to be important for suspended particulate alkenones in the Ligurian Sea (Rontani *et al.*, 2009b). Unfortunately, the free radical autoxidation products of

alkenones are insufficiently stable and display chromatographic characteristics that are too poor to be directly used as effective tracers of alkenone autoxidation. As an alternative solution, the use of autoxidation compounds of monounsaturated fatty acids, sterols or chlorophyll phytyl side-chain may help in cases where autoxidation of organic matter has been significant, and thus where alkenones may be autoxidized. For example, in the Ligurian Sea, we used the good correlation between $U_{37}^{K'}$ and concentrations of specific Δ^5 -stenol autoxidation products with depth to infer that selective autoxidation of alkenones also occurs and alters $U_{37}^{K'}$ values. In the present EqPac POM (suspended and sinking) samples, however, we did not observe any correlation between $U_{37}^{K'}$ and known autoxidation products of sterols, oleic acid and chlorophyll phytyl side-chain with depth, leading us to conclude that autoxidation of alkenones is not important in the EqPac.

4. Overall implications for POM degradation mechanisms

We have measured a suite of products that arise from the degradation of chlorophyll, oleic and cis-vaccenic acids, sterols and alkenones in suspended and sinking particles from equatorial Pacific Ocean. By examining abundances of these products and their respective precursors, we can begin construct a conceptual model describing the relative importance of biological vs abiotic processes in degrading lipids in the EqPac (Fig.VI-7), and by analogy the open ocean in general. Biodegradation, photooxidation and autoxidation all affect lipids that are associated with both suspended and sinking particles, but to varying degrees. Although we did not specifically discuss heterotrophy by zooplankton (except brief mention in the chlorophyll case), it plays a major role in POM degradation and in exchange of material between suspended and sinking particle pools via aggregation (through fecal pellet production) and disaggregation (sloppy feeding) of particles. Light-induced, singlet oxygen-producing photoprocesses occur in sunlit surface waters and may be more efficient for suspended POM than for sinking POM, probably due to longer residence times of the suspended material in the photic zone, although this conclusion may be equivocal for the EqPac. When photodegradation of phytodetritus is extensive, such as for suspended POM in the photic zone, singlet oxygen inhibits bacterial growth and hence limits biodegradation. On

the other hand, once POM is transported to the aphotic mesopelagic zone and below, the absence of light precludes photooxidative production of singlet oxygen so that biodegradation becomes the dominant degradation process. Autoxidation may occur throughout much of the water column (and in surface sediments).

Examination of sterol degradation products shed light on how different compounds within a single lipid class but associated with different particle pools behave. Using cholest-5-en-3 β -ol and 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol as indicators of zooplankton- and phytoplankton-derived OM, respectively, we conclude that planktonic lipids in general are quite susceptible to biodegradation, and that biodegradation products are generally more abundant in sinking than suspended particles. In contrast, terrigenous/vascular plant OM, e.g. 24-ethylcholesta-5-en-3 β -ol, is strongly autoxidized on land and/or in the atmosphere as it is transported to the remote ocean, but is only weakly biodegraded during sedimentation in the open ocean EqPac environment. Finally, biodegradation of alkenones, as indicated by the presence of epoxyalkenones in the EqPac POM, may generate a “warm bias” on the alkenone-based $U_{37}^{K'}$ paleotemperature in the EqPac.

Our results also address a synergy between senescing phytoplankton cells and attached bacteria and between photooxidation and biodegradation. Photolysis of chlorophyll in senescing algal cells produces singlet oxygen, which if transferred from algal cells to attached bacteria may inhibit bacterial growth and reduce the extent of heterotrophic degradation. On the other hand, we speculate that an abundance of charged mineral surfaces, such as siliceous diatom frustules in sinking particles, may reduce the lifetime of 1O_2 and allow for enhanced bacterial growth and biodegradation in sinking particles compared to suspended particles. It seems thus that there is a direct link between the photooxidation state of lipids of senescent phytoplanktonic cells in suspended particles and their recalcitrance towards biotic degradation. These results could help explain some previous observations made by Gowing and Silver (1983) and Karl and Knauer (1984) in northeast Pacific Ocean that sinking particles contain a much more active bacterial community than suspended particles.

It is interesting to compare the relative importance of biodegradation vs. photooxidation in the equatorial Pacific with other oceanic systems. Similar to what we report here for the EqPac, suspended particulate lipids in the Mediterranean Sea are strongly affected by photooxidation but biodegradation was relatively minor (Rontani *et al.*, 2009b).

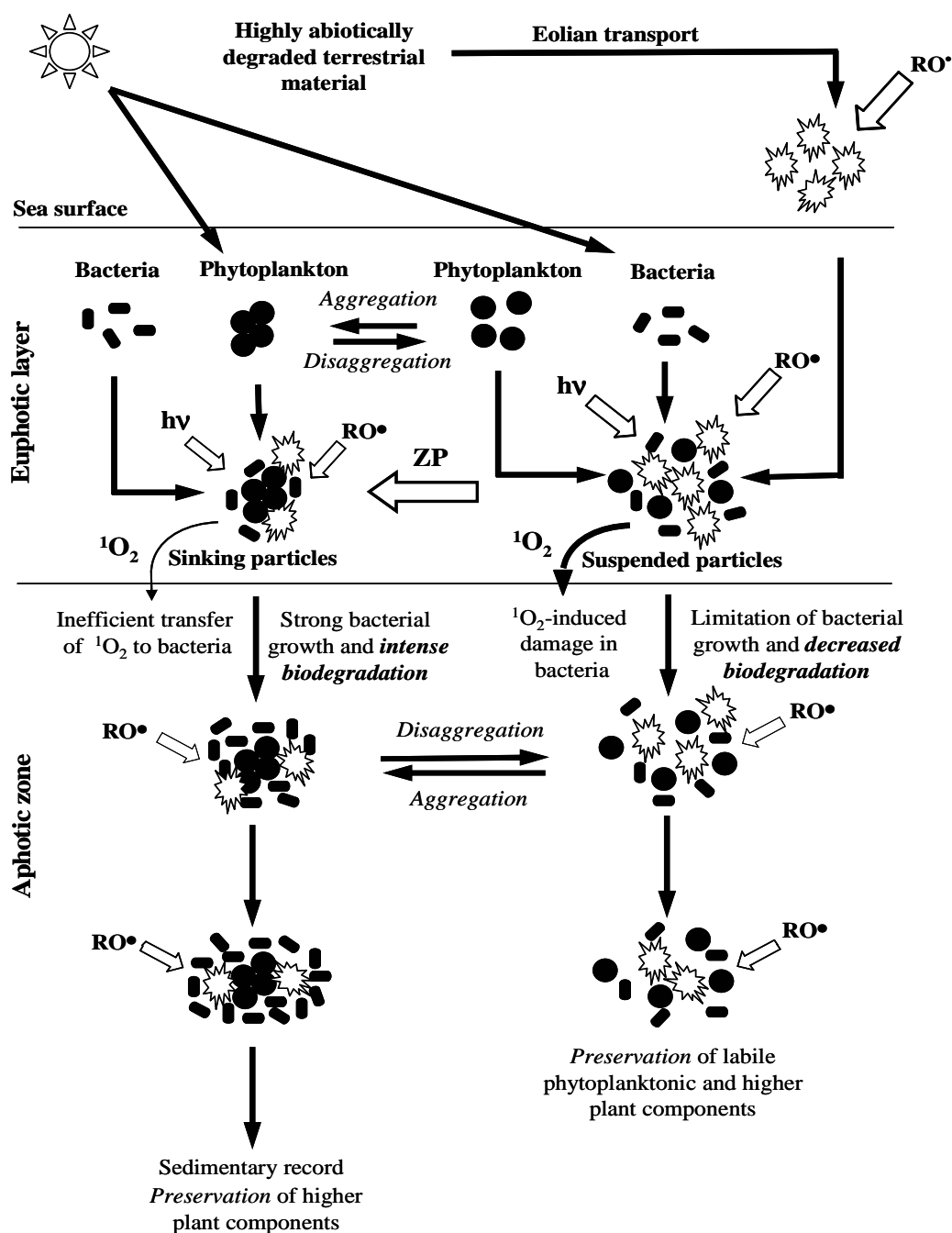


Fig. VI-7. Conceptual model showing the relative importance of photooxidation ($h\nu$), autoxidation (RO^\bullet) and bacterial biodegradation on autochthonous phytodetritus and allochthonous vascular plant lipids in sinking and suspended particles. The important role played by zooplankton (ZP) in OM degradation is included in the schematic but was not discussed extensively in the text. Both zooplankton grazing and physical processes affect exchange of POM via aggregation and disaggregation. Sizes of open arrows indicate relative importance of each degradative process. In general, suspended lipids are most susceptible to photooxidation in the photic zone, with transfer of photooxidatively produced singlet oxygen inhibiting bacterial degradation. Sinking POM is less affected by photooxidation and thus more susceptible to bacterial degradation. Terrigenous material is most affected by autoxidation, either on land or during atmospheric transport to the ocean.

In the Mediterranean Sea, biodegradation also generally predominated in sinking particles, with the extent of biotic degradation increasing with depth in the water column (Christodoulou et al., 2009). In the Black Sea where microbial activity is intense at the redox boundary and in the underlying anoxic zone, biodegradation of suspended phytodetritus strongly dominated over photooxidation (Rontani & Wakeham, 2008).

We now know that it is not possible to discuss the fate of particulate marine lipids simply in terms of biodegradation. Abiotic processes can be equally important, or even more important, in some marine systems. There are apparently also differences between the relative importance of biotic and abiotic processes for suspended vs sinking POM and as a function of lipid class. Particular attention should be given in the future to the synergy between photooxidative production of singlet oxygen in senescent phytoplanktonic cells, its transfer to attached bacteria, and subsequent biodegradation. The mechanisms of POM degradation and the relative importance of each of the processes we have discussed here are fundamental to the balance between degradation and preservation of organic material during sedimentation.

Acknowledgements

We thank James L.K.B. Bishop for MULFVS sampling during the EqPac expeditions. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de la Méditerranée. This research was also supported by the US National Science Foundation Chemical Oceanography Program through grants NSF OCE- 90-22238 and OCE 05-50654.

CHAPITRE VII

Conclusions et perspectives

1. Les principales conclusions de ce travail

Comme nous avons pu le voir tout au long de ce manuscrit, il est évident que l'indice d'insaturation des alcénones ($U_{37}^{K'}$), utilisé comme paléomarqueur des températures de surface depuis la fin des années 80, présente des limites dans son utilisation. La comparaison des températures estimées à partir de cet indice et les maSSTs mesurées *in situ* (ou les températures estimées à partir d'autres paléomarqueurs) montre de nombreuses incohérences. Nous l'avons vu, de nombreux facteurs peuvent influencer sur les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et introduire des erreurs dans l'interprétation des paléotempératures. Il convient de faire un tri de ce qui pourrait avoir un réel impact sur l' $U_{37}^{K'}$ en milieu naturel. Alors que certains paramètres environnementaux autres que la température (disponibilité en nutriment, taux de croissance, luminosité, etc.) semblent n'avoir qu'un impact négligeable *in situ*, la dégradation sélective (perte préférentielle de l'alcénone la plus insaturée) biotique et abiotique des alcénones, jusqu'alors partiellement ignorée, peut être à l'origine de biais significatifs dans les valeurs de paléotempératures estimées à partir de l' $U_{37}^{K'}$.

1.1. Les effets des processus diagénétiques sur les alcénones

Durant cette thèse nous nous sommes focalisés sur l'effet des processus diagénétiques sur les alcénones et sur leurs impacts sur les estimations de paléotempératures effectuées à partir de l'indice $U_{37}^{K'}$. En effet, les processus de dégradation bactérienne, d'autoxydation ou encore de stéréomutation se sont avérés potentiellement sélectifs vis-à-vis des alcénones di- et tri-insaturées lors d'incubations de cellules de l'haptophyte *E. huxleyi in vitro* (Rontani *et al.*, 2005a; 2008). Cependant, les expériences en laboratoire menées jusqu'alors ne permettaient pas d'évaluer l'impact de ces différents processus dans le milieu naturel. Aussi, nous avons entrepris d'étudier ces différents processus de dégradation de manière plus approfondie, *in vitro* dans un premier temps, puis *in situ*.

1.1.1. Des bactéries capables de dégrader les alcénones: quel impact sur les estimations de paléotempérature?

Afin de vérifier les variations des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ observées lors de différents essais de biodégradation aérobie de cellules d'*E. huxleyi*, l'étude de la biodégradation bactérienne des alcénones est apparue nécessaire.

La première étape de ma thèse a permis d'isoler et d'identifier des bactéries capables de dégrader les alcénones. La capacité de ces souches à dégrader les alcénones a été testée sur 7 souches bactériennes isolées à partir de cultures d'*E. huxleyi* au cours de ce travail (Zabeti *et al.*, 2010b). Étonnamment toutes les souches (à l'exception d'une) se sont avérées capables de dégrader les alcénones. Seule, la souche *Dietzia maris* a cependant montré une capacité à dégrader sélectivement ces composés. Cette dégradation sélective fait intervenir une époxydation initiale des doubles liaisons des alcénones, qui est vraisemblablement induite par une monooxygénase ayant une plus grande affinité pour la double liaison en position $\omega 29$. La sélectivité de la dégradation a conduit à une augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ variable de +0,05 à +0,10 (soit une augmentation de température de +1,5 à +3,0°C).

Bien que, dans ce travail, la capacité à dégrader sélectivement les alcénones n'ait pu être démontrée sans ambiguïté que pour la souche *D. maris*, il semble probable qu'en milieu naturel d'autres souches bactériennes aérobies soient potentiellement capables d'attaquer les doubles liaisons des alcénones et d'altérer ainsi l'indice $U_{37}^{K'}$. Cette hypothèse est confortée par la détection de quantités importantes d'époxyalcénones associées à une augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dans des échantillons de sédiments de la mer Noire (Rontani & Wakeham, 2008; Cf. Ch. I-6.2), du sud-est de l'Alaska (Prahl *et al.*, 2010; Cf. Ch. V), de la zone d'upwelling du Pérou et dans du matériel particulaire du Pacifique équatorial (Rontani *et al.*, soumis à *Limnology and Oceanography*; Cf. Ch. VI).

La surestimation des températures résultant de la dégradation bactérienne sélective des alcénones a pu être estimée à +0,7 à +2,4°C (selon les sites) dans les sédiments de surface de la région géographique du sud-est de l'Alaska (Cf. Ch. V) et à +2°C dans le matériel particulaire prélevé par trappes dans l'océan Pacifique équatorial (Cf. Ch. VI).

L'effet des processus de dégradation bactérienne aérobie sur les alcénones n'est donc pas à négliger et devra être pris en considération lors des études à venir spécialement lorsqu'il existe des preuves d'une dégradation bactérienne substantielle des alcénones (présence d'époxyalcénones) dans la matière organique déposée.

1.1.2. Les processus d'autoxydation et de stéréomutation peuvent ils induire un biais significatif des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ dans le milieu naturel ?

Lors de nos travaux en mer Méditerranée (Rontani *et al.*, 2009b; Cf. Ch. IV), nous avons mis en évidence que les processus d'autoxydation et de stéréomutation peuvent également mener à

une dégradation sélective des alcénones et entraîner des biais significatifs dans l'estimation des paléotempératures. En effet, la présence d'alcénones stéréomutées dans nos échantillons sédimentaires, nous a permis d'estimer que le biais résultant de l'action des processus de stéréomutation sur les alcénones au nord-ouest de la mer Méditerranée correspondait à une augmentation des valeurs de l'indice $U_{37}^{K'}$ de +0,05 soit une surévaluation des températures de +1,3°C (résultats équivalents à ceux obtenus en mer Noire, Cf. Ch. I-6.1).

L'instabilité des produits d'autoxydation spécifiques des alcénones rend la mise en évidence de ces processus en milieu naturel très difficile. L'utilisation de produits d'autoxydation spécifiques d'autres lipides (e.g. stérois, acides gras mono-insaturés, chaîne phytyle de la chlorophylle) s'est révélée une solution alternative pour évaluer l'ampleur de ces processus *in situ*. En raison de leur relative stabilité et de leur spécificité, nous avons utilisé les produits de dégradation des Δ^5 -stérois afin d'estimer l'importance relative des processus biotiques et abiotiques dans notre étude en mer Méditerranée. Une bonne corrélation a été observée entre l'augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ avec la profondeur et les concentrations de produits d'autoxydation des Δ^5 -stérois dans nos échantillons de matériel particulaire du nord-ouest de la mer Méditerranée, ce qui nous a permis d'attribuer l'augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ avec la profondeur à l'intervention de processus autoxydatifs.

1.2. La correction des biais résultant de la diagenèse des alcénones est-elle possible?

Il est à présent évident que durant leur diagenèse, les alcénones peuvent subir une altération sélective pouvant conduire à une surévaluation de l'indice $U_{37}^{K'}$ et donc des paléotempératures. De ce fait, nous nous sommes également appliqués à réaliser une "courbe corrective" permettant de quantifier et de corriger les effets des processus de dégradation sélective des alcénones.

Préalablement, Rontani et Wakeham (2008) avaient proposé une "courbe corrective" des processus de stéréomutation permettant d'évaluer dans les échantillons naturels, la surestimation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ en fonction de la proportion d'alcénones stéréomutées (courbe réalisée à partir de données obtenues durant des incubations de *Chrysotila lamellosa* dans un mélange méthane-thiol-éthane-thiol; Cf. Ch. I- 6.1).

En partant du même principe, grâce à l'existence de traceurs spécifiques aux processus de dégradation bactérienne sélective suffisamment stables pour être quantifiés lors de l'analyse d'échantillons lipidiques par CPG-SMEI (les époxyalcénones), nous avons pu relier la

variation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ résultant de cette biodégradation sélective à la proportion relative des époxyalcénones issues de la biodégradation des alcénones parentes $C_{37:2}$ et $C_{37:3}$ (courbe réalisée à partir de données obtenues durant des incubations de cellules d'*E. huxleyi* avec différentes communautés bactériennes; Rontani *et al.*, 2008; Cf. Ch. V). La "courbe corrective" résultante nous permet de quantifier dans le milieu naturel la surévaluation de l'indice $U_{37}^{K'}$ résultant d'une biodégradation sélective des alcénones.

Du fait de leur forte sélectivité, il aurait été également très intéressant de pouvoir évaluer l'impact des processus autoxydatifs sur les estimations de paléotempérature (Cf. tableau VII-1) Malheureusement, le manque de traceurs stables et spécifiques de l'autoxydation des alcénones ne nous a pas permis de réaliser des courbes correctives pour ces processus. L'utilisation de traceurs "indirects" (e.g. produits d'autoxydation des stérols) permet toutefois de mettre en évidence leur intervention (Rontani & Wakeham, 2008; Rontani *et al.*, 2009; Cf. Ch. IV).

Tableau VII- 1. Tableau récapitulatif des différents processus de dégradation des alcénones, de leurs impacts sur les estimations de paléotempératures et de leurs corrections

Processus de dégradation	Biais potentiel de l'indice $U_{37}^{K'}$	Equivalence en température	Correction des biais possible?	Traceurs des biais
Photo-oxydation (UV-PAR)	+0,04	1°C	Non	Corrélation avec d'autres traceurs lipidiques
Autoxydation	+0,20	6°C	Non	Corrélation avec d'autres traceurs lipidiques
Biodégradation sélective aérobie	+0,10	3°C	Oui	Epoxyalcénones
Stéréomutation	+0,05	1,3°C	Oui	Alcénones stéréomutées

1.3. Des relations haptophytes-bactéries complexes

Au cours de nos recherches réalisées *in situ*, nous avons pu observer qu'une forte autoxydation des alcénones était généralement associée à une faible dégradation bactérienne et vice-versa. Une explication à cette relation inverse qui semble exister entre les processus de dégradation biotique vs. abiotique a pu être fournie lors de l'étude de la dégradation de la matière organique particulière dans le Pacifique équatorial (Rontani *et al.*, soumis à

Limnology and Oceanography; Cf. Ch. VI). Les relations entre le phytoplancton et les bactéries hétérotrophes qui leur sont associées ne semblent pas se limiter à la consommation des phytodétritus ou des exopolysaccharides excrétés lors de la croissance algale par les bactéries. En effet, les cellules phytoplanctoniques sénescents peuvent potentiellement induire l'intervention de processus photo- et autoxydatifs (initiées par un transfert de l'oxygène singulet) chez les bactéries qui leur sont associées (Rontani *et al.*, 2003a; Christodoulou *et al.*, 2010). L'absence de système photoprotecteur chez les procaryotes hétérotrophes (Garcia-Pichel, 1994) entraîne des dommages cellulaires importants limitant considérablement la croissance bactérienne et par conséquent la biodégradation des composants cellulaires du phytoplancton.

Lors de notre étude, nous avons observé que ce transfert d'oxygène singulet était bien plus efficace dans les particules en suspension que dans celles prélevées par trappes. L'abondance de diatomées riches en silice (dont la polarité diminue considérablement la durée de vie de l'oxygène singulet) dans les plus grandes particules semble une bonne hypothèse afin d'expliquer l'intense biodégradation qui y est observée.

1.4. $L'U_{37}^{K'}$, un bon paléomarqueur des températures des eaux de surface?

En résumé, des efforts semblent encore nécessaires afin d'obtenir une technique robuste, rigoureuse et standardisée, permettant d'estimer les changements climatiques à travers l'échelle des temps géologiques à partir de l'indice d'insaturation des alcénones $U_{37}^{K'}$. De nombreux aspects concernant l'écologie des Prymnesiophyceae (tels que la saisonnalité ou la profondeur de croissance), leur diversité et leur histoire à l'échelle des temps géologiques (extinction et extension des successions d'espèces concernées) et les limitations liées aux problèmes de calibration (la calibration employée est-elle représentative des populations naturelles de coccolithophores et de la variété de leur habitat ?) sont autant de points à élucider afin d'interpréter avec assez de précision le signal des alcénones enregistré dans les sédiments. Après avoir répondu à la question essentielle qui est de savoir quel signal de température est réellement enregistré par les alcénones, un autre point important est le devenir de ce signal lors de la diagenèse. Afin d'exploiter pleinement les informations apportées par l'indice d'insaturation des alcénones, qui est en définitive préservé lors des enregistrements sédimentaires, il est essentiel de prendre en compte l'impact des processus biotiques et

abiotiques agissant tout au long de la colonne d'eau et à la surface du sédiment (Harvey, 2000).

Bien que cette thèse ait mis en avant de nouvelles limites de ce paléomarqueur, il faut relativiser les imperfections de cet outil car ses nombreuses qualités (stabilité, facilité d'analyse, précision des mesures, etc.) le place comme l'un des meilleurs paléomarqueurs des températures des eaux de surface actuels. L'important demeure toutefois de savoir reconnaître ses limites en apprenant à identifier les phénomènes pouvant modifier les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et lorsque cela est possible d'en corriger leur effet (Cf. tableau VII-1).

Bien que de nombreux paléomarqueurs de la température des eaux de plus en plus performants (TEX₈₆, HBI, $U_{37}^{K'}$) aient vu le jour ces dernières années, l'ensemble des paléothermomètres utilisés pâtissent d'incertitudes liées à des problèmes de conservation du signal et de perturbations par d'autres variables environnementales (pH, dissolution, dégradation biotique et abiotique, etc.). Une meilleure approche consisterait à utiliser plusieurs paléomarqueurs afin de lisser les différents résultats obtenus ce qui permettrait de palier aux biais respectifs des différents paléomarqueurs et de faire concorder les paléotempératures estimées.

2. Les perspectives

Les résultats obtenus tout au long de cette thèse ont soulevé de nouvelles interrogations et il serait donc intéressant d'effectuer plusieurs études afin de compléter ces travaux.

2.1. Spécificité des bactéries associées aux cellules d'*E. huxleyi*?

Bien que les souches bactériennes que nous avons isolées de nos cultures d'*E. huxleyi* (Zabeti *et al.*, 2010b; Ch. II) apparaissent être des bactéries marines, préalablement observées dans le milieu naturel et donc probablement inféodées à la souche d'*E. huxleyi*, il serait intéressant de confirmer que leur présence résulte bien d'une association naturelle entre ces bactéries et l'haptophyte.

Dans ce but, une expérience de chimiotactisme va être menée dans le cadre du projet BACWIM (CNRS-INSU EC2CO MicroBien) afin de déterminer si les bactéries isolées lors de notre étude sont naturellement attirées par *E. huxleyi* et/ou par les alcénones (utilisation d'alcénones purifiées).

2.2. Présence de bactéries aptes à dégrader sélectivement les alcénones *in situ*?

Si la présence de *D. maris* se révèle associée aux blooms phytoplanctoniques, il serait très intéressant grâce aux outils de biologie moléculaire de rechercher des sondes permettant de mettre en évidence, voire de quantifier (PCR quantitative), les bactéries potentiellement capables de réaliser une biodégradation sélective des alcénones *in situ*. Cela pourrait être possible en construisant des couples d'amorces spécifiques permettant de cibler les souches d'intérêts dans les échantillons prélevés lors de blooms d'*E. huxleyi*. Nous pourrions ainsi corréler la présence, voire le nombre, de bactéries aptes à dégrader sélectivement les alcénones (telles que *D. maris* sp S1) à des augmentations de l'indice $U_{37}^{K'}$. Ces résultats permettraient de valider les travaux que nous avons effectués *in vitro*.

2.3. Validité des "courbes correctives" ?

Les "courbes correctives", réalisées dans le but de quantifier et de corriger les biais résultant de la dégradation bactérienne aérobie et de la stéréomutation des alcénones (Cf. Ch. II et Ch. VII-1.2), pourraient être améliorées. Afin d'obtenir des points supplémentaires permettant d'affiner les courbes, l'obtention de cultures axéniques d'*E. huxleyi* dépourvues de traceurs spécifiques de ces processus de biodégradation (époxyalcénones) et de stéréomutation (alcénones stéréomutées) constitue une étape nécessaire. Cependant, l'axénisation d'une culture phytoplanctonique n'est pas aisée et demande un travail laborieux.

L'étape suivante sera de vérifier si ces courbes de corrections réalisées à partir de données *in vitro* permettent réellement d'évaluer et de corriger les biais résultant de la diagenèse des alcénones *in situ*. La comparaison des températures estimées à partir des valeurs de l'indice $U_{37}^{K'}$ après correction et les maSSTs devra être étendue à une grande diversité de zones géographiques afin de confirmer la validité de ces outils. Les premiers résultats obtenus à partir de données provenant de la région de l'upwelling du Pérou semblent très prometteurs.

2.4. Inhibition du transfert d'oxygène singulet du phytoplancton aux bactéries associées par la silice ?

Au cours de nos travaux dans l'océan Pacifique équatorial (Cf. Ch. VI et Ch. VII-1.3), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle dans les particules riches en silice, le transfert de l'oxygène singulet des cellules phytoplanctoniques sénescents aux bactéries hétérotrophes

associées serait considérablement limité, permettant ainsi une forte dégradation bactérienne de ces particules. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des cultures non axéniques de diatomées silicifiées et non silicifiées et de comparer les résultats obtenus. Le suivi de l'état de dégradation de l'acide vaccénique lors de ces différentes incubations nous permettrait de déterminer l'importance des processus de photo- et autoxydation dans les cellules bactériennes.

2.5. La stéréomutation des alcénones est-elle possible dans des conditions aérobies?

Certains résultats récents semblent indiquer que les processus de stéréomutation des alcénones (isomérisation *cis-trans* de leurs doubles liaisons; Cf. Ch. I-5.4) qui résultent de l'action des radicaux thiyles (R-S•) et que nous avons mis en évidence en anaérobiose, peuvent également intervenir dans des conditions aérobies. Dans ces conditions, la formation de méthane-thiol qui est à l'origine de la production de radicaux thiyles (Rontani *et al.*, 2006b) pourrait résulter de l'action de bactéries du genre *Roseobacter*. En effet, ces bactéries photo-hétérotrophes (AAPs) sont capables de convertir le DMSP en méthane-thiol et sont souvent associées aux blooms d'*E. huxleyi*.

Il serait donc intéressant d'effectuer des incubations de cellules d'*E. huxleyi* en présence de différentes souches de *Roseobacters* afin de tâcher de mettre en évidence une stéréomutation aérobie des alcénones. Des mesures de production de méthane-thiol pourraient être également effectuées au cours des incubations (analyses en spectrométrie de masse).

2.6. Le cas particulier de la mer Noire

La mer Noire est une zone particulièrement intéressante à étudier. En effet, une dégradation bactérienne très intense et particulièrement sélective des alcénones y a été observée (augmentation des valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ de l'ordre de +0,15; Rontani & Wakeham, 2008). L'isolement de bactéries aptes à dégrader les alcénones dans cette zone serait donc très judicieux.

De plus, des alcénones particulières (possédant des doubles liaisons espacées de trois groupements méthylènes y ont été détectées (sédiments datant de l'Holocène, Xu *et al.*, 2001 ; Prahl *et al.*, 2006b). Récemment, une alcénone en C_{36:2} possédant également cet espacement caractéristique a pu être détectée dans la colonne d'eau de la mer Noire (Rontani & Wakeham, 2008). Cette observation suggère que l'organisme, qui est à l'origine de la

production de ces alcénones particulières, est présent actuellement dans la mer Noire et pourrait donc être isolé et caractérisé.

CHAPITRE VIII

Partie expérimentale

1. Micro-organismes et conditions de cultures

1.1. Les souches algales

La souche *Emiliania huxleyi* TWP1 utilisée pour les isolements bactériens provient de la banque algale de Caen (France).

La souche d'*E. huxleyi* CS-57 (Lohmann) Hay & Mohler, a été isolée par R. Guillard en 1960 d'une zone inconnue de la mer des Sargasses. Elle est conservée par la collection nationale de cultures algales Australienne (ANACC – anciennement nommé CSIRO) dans du milieu f/2 (Jeffrey & LeRoi, 1997) à 20°C et une intensité lumineuse de 80 $\mu\text{mol photons.m}^2.\text{s}^{-1}$.

1.2. Les différentes souches bactériennes

Sept souches ont été isolées au cours de cette étude et identifiées comme étant: *Oceanicaulis alexandrii*, *Stappia* sp. AG2, *Sphingomonas* sp. AG6, *Dietzia maris* sp. S1, *Nocardioides* sp. S3, *Marinobacter* sp. S2 et *Micrococcus* sp. AG10.

1.3. Le milieu et les conditions de culture d'*E. huxleyi* TWP1

Le milieu de culture f/2 (Guillard & Ryther, 1962) utilisé pour la croissance d'*E. huxleyi* TWP1 est constitué, pour 1 litre d'eau de mer naturelle filtrée, de 1 ml de chacune des 6 différentes solutions mères suivantes : (1) NaNO_3 : 75 g.l^{-1} , (2) NaH_2PO_4 : 0,5 g.l^{-1} , (3) Na_2SiO_3 : 12 g.l^{-1} ; (4) thiamine HCl: 0,1 g.l^{-1} , (5) biotine: 0,5 mg.l^{-1} et (6) vitamine B12: 0,2 mg.l^{-1} , ainsi que de 1 ml de deux solutions mères de métaux constituées pour la première de (7) $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$: 2,7 g.l^{-1} et EDTA: 1,7 g.l^{-1} et pour la seconde de (8) $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 22 mg.l^{-1} , $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$: 18 mg.l^{-1} , $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$: 70,5 mg.l^{-1} , $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$: 117,6 mg.l^{-1} et $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 9,91 mg.l^{-1} .

Le pH du milieu a été ajusté entre 7,6 et 7,8 avec de l'acide chlorhydrique à 37% puis le milieu a été stérilisé à l'autoclave durant 20 minutes à 120°C.

Une pré-culture de 100 ml d'*E. huxleyi* TWP1 a été transférée dans un flacon contenant 1500 ml de milieu f/2. La croissance s'est déroulée à 20°C, sous une lumière fluorescente blanche (Orsam fluora, 116 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) avec un cycle jour-nuit de 12:12h durant 10 jours.

1.4. Isolement de souches bactériennes à partir des cultures d'*E. huxleyi* TWP1

Après 7 jours de culture, plusieurs dilutions de la culture algale ont été réalisées (10^{-1} à 10^{-5}) et 0,1 ml de chacune des dilutions ont été étalées stérilement sur des boîtes de Pétri gélosées contenant 5 g d'extrait de levure (Merieux), 5 g de Biotrypcase (Merieux) et 15 g d'agar (Merieux) pour 1 litre d'eau de mer synthétique (NaCl: 11,7 g; MgSO₄: 12,3 g; KCl : 0,75 g; CaCl₂: 1,47 g ; Tris: 6,05 g; NH₄Cl: 3,7 g pour 1 l d'eau distillée; Baumann & Baumann, 1981) à pH 7,8. Après croissance, 10 jours à 20°C, chaque colonie a été repiquée plusieurs fois sur boîtes de Pétri afin de vérifier sa pureté. Ainsi 29 souches bactériennes ont pu être isolées. Tous les isolats ont été stockés en présence de glycérol (20%) dans de l'azote liquide.

1.5. Milieux et conditions de croissance des cultures bactériennes

1.5.1. Les substrats

1.5.1.1. Les cellules lyophilisées d'*E. huxleyi* CS-57

En raison des variations de l'indice d'insaturation entre les différentes cultures, un stock de cellules lyophilisées de la souche d'*E. huxleyi* CS-57 issu d'une seule culture en grand volume a été utilisé comme substrat lors de nos incubations bactériennes. 1200 ml d'une pré-culture d'*E. huxleyi* CS-57 en fin de phase logarithmique ont été utilisés pour inoculer 3100 ml de milieu f/2 dans une bonbonne de verre de 10 l. La culture a été cultivée dans un environnement contrôlé constant, sous une température de 20 °C et une intensité lumineuse de 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ avec un cycle jour-nuit de 16:8 h et a été légèrement aérée avec un filtre à air (47 mm, 0,2 μm). Au bout de 4 semaines, les cellules ont été centrifugées et lyophilisées.

1.5.1.2. Les alcénones en C₃₇ purifiées à partir des cellules d'*E. huxleyi* CS-57

Se reporter au paragraphe 3.11.

1.5.2. Milieux et conditions de croissance

Les milieux riches sont préparés avec de l'eau de mer synthétique (Cf. Ch VII- 1.4) autoclavée contenant de l'extrait de levure (5 g.l⁻¹) et de la peptone (5 g.l⁻¹).

Le milieu de croissance Eh a été préparé à partir d'eau de mer synthétique supplémentée en sulfate de fer (0.1 mM) et du phosphate de potassium (0.33 mM). Les cultures aérobies sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu Eh et des cellules lyophilisées stérilisées de la souche *E. huxleyi* CS-57 (12 mg par flacon) ou des méthyles alcénones purifiées (1 mg par fiole, Cf. Ch. VII-3.11) comme substrats.

Les cultures sont incubées à 20°C sous agitation (agitateur réciproque 96 rev.min⁻¹, 5 cm d'amplitude).

Pour le suivi des cinétiques de dégradation des alcénones 4 flacons ont été inoculés simultanément, un pour surveiller la croissance et la biodiversité et les autres dans le but de mesurer les valeurs de l' $U_{37}^{K'}$ et d'identifier les métabolites produits durant les incubations. Afin de contrôler la dégradation des alcénones par les différentes bactéries, des contrôles stériles ont été préparés de la même manière mais sans ajout de l'inoculum bactérien avant l'incubation.

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1. L'extraction d'ADN à partir de cultures bactériennes

Des extractions d'ADN ont été effectuées à partir des cultures d'*E. huxleyi* TWP1 utilisées pour l'isolement ou des cultures des bactéries isolées au cours de cette étude. La lyse cellulaire et l'extraction d'ADN ont été réalisées selon la méthode décrite par Zhou *et al.* (1996). Le culot de cellules bactériennes provenant de 1 ml de culture est remis en suspension dans 0,5 ml de tampon TESC (0,1 M Tris, 0,1 M EDTA, 1,5 M NaCl, 1% CTAB, pH 8). Afin de lyser les bactéries, la suspension a subi 3 cycles de congélation/décongélation puis a été incubée en présence de 55 µl de dodecylsulfonate de sodium (SDS 10%) et de 2,5 µl de protéinase K (40 mg/ml).

L'ADN a été extrait par un traitement phénol/chloroforme/alcool isoamylique, précipité dans 0,6 volume d'alcool isopropylique puis centrifugé 30 minutes à 15 000 rpm. Le culot a été lavé à l'éthanol 70% et séché sous vide. Les acides nucléiques ont été repris dans 50 µl d'eau

stérile filtrée, contenant 2 µl de RNase afin de détruire toute trace d'ARN et conservés à 20°C.

2.2. Les réactions en chaîne par polymérase (PCRs)

2.2.1. La PCR-DGGE

Le mélange réactionnel (20 mM Tris-HCl ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂) a été réalisé dans un volume final de 25 µl et contenait 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP), 25 pmol de chaque amorce (GM5F et 907RA, tableau VIII-1) et 0,5 unité de Taq polymérase (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). Le protocole de la PCR-DGGE était similaire à celui mis au point par Muyzer *et al.* (1993). Les produits de PCR obtenus ont ensuite été déposés sur un gel d'électrophorèse à gradient dénaturant (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Afin d'améliorer la détection des variations génétiques des fragments d'ADN amplifiés, une séquence d'ADN riche en G et en C (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGC-3') a été attachée à l'extrémité 5' de l'amorce GM5F.

Chaque cycle de PCR-DGGE était composé d'une phase de dénaturation de l'ADN (1 minute à 94 °C), d'une phase d'hybridation des amorces et d'une phase d'élongation (1 minute à 72 °C). L'hybridation des amorces a été effectuée selon un protocole "touchdown" (Muyzer *et al.* 1993) selon lequel la température d'hybridation initiale est de 10 °C supérieure à la température optimale. Elle diminue ensuite de 1 °C tous les deux cycles pendant 20 cycles pour atteindre la température optimale d'hybridation. La PCR a été poursuivie durant 14 cycles à cette température optimale et achevée par une élongation finale de 5 minutes à 72 °C. Comme pour une amplification classique, la taille des produits d'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) contenant du bromure d'éthidium (1µg/ml).

2.2.2. Amplification du gène codant pour le 16S rRNA

Le mélange réactionnel (20 mM Tris-HCl ; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂) a été réalisé dans un volume final de 25 µl et contenait 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP), 50 pmol de chaque amorce (Eu3, Eu5b, tableau VIII-1) et 0,5 unité de Taq polymérase (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). L'amplification par PCR a été

effectuée dans un minicycler (MJ Research) pendant 30 cycles. La matrice d'ADN a été initialement dénaturée 3 minutes à 94 °C. Chaque cycle comprenait une étape de dénaturation de l'ADN bicaténaire (généralement 30 secondes, 94 °C), une étape d'hybridation des amorces (30 secondes, température spécifique pour chaque couple) et une étape d'élongation (40 secondes à 1 minute à, 72 °C). L'amplification se terminait par une ultime étape d'élongation à 72 °C pendant 3 minutes. Face à la difficulté d'amplifier certains fragments d'intérêt pour certaines souches d'autres amorces anti-sens ont aussi été utilisées: Rd1 pour *Oceanicaulis alexandrii* et 1392 r pour *Dietzia maris* (tableau VIII-1).

Tableau VIII-1. Séquences des amorces utilisées.

Amorces	Sens	Gènes	Séquences de l'amorce (5'→3')	Température d'hybridation	Taille du fragment	Références
GM5F	Sens	ARNr 16S	CCGCCTACGGGAGG CAGCAG	55°C	585 pb	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
907 RA	Anti-sens	ARNr 16S	CCGTCAATTCATTTG AGTTT	55°C	585 pb	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
Eu3	Sens	ARNr 16S	AAGGAGGTGATCCA GCC	55°C	1500pb	Rontani <i>et al.</i> , 1997c
Eu5b	Anti-sens	ARNr 16S	AGAGTTTGATNMTG GCTCAGA	55°C	1500pb	Rontani <i>et al.</i> , 1997c
Rd1	Anti-sens	ARNr 16S	AAGGAGGTGATCCA GCC	55°C	1500pb	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
1392r	Anti-sens	ARNr 16S	ACGGGCGGTGTGTGT RC	55°C	1500pb	Julian <i>et al.</i> , 1998

La taille attendue (1500 pb) et la pureté des produits d'amplification ont été testées par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) contenant du bromure d'éthidium (1 µg/ml).

2.3. L'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)

La DGGE a été réalisée en utilisant le système D-Code Universelle (laboratoires Bio-Rad). Les échantillons contenaient des quantités approximativement équivalentes de produits de PCR (300 ng). Un mélange de produits de PCR issus de l'amplification du gène codant pour

l'ARNr 16S de trois souches de collection (*Clostridium perfringens*, 560 bp, G+C= 52.8%; *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, 580 bp, G+C=51%; et *Micrococcus luteus*, 571 bp, G+C= 57.6%) a été utilisé comme standard de mobilité (2 µl de chaque produit PCR).

Le gel DGGE de 1 mm d'épaisseur était constitué de 6% (poids/volume) de polyacrylamide présentant un gradient de dénaturation allant de 30 à 50% pour les gènes de l'ARNr 16S (100% de dénaturation correspondant à 7 M d'urée et 40% de formamide).

La migration s'est déroulée à 60°C durant 5,5 heures à 150 V dans du tampon d'électrophorèse Tris-acétate-EDTA (TAE) 1x (40 mM de Tris-HCl, 20 mM d'acide acétique et 1 mM d'EDTA). Suite à l'électrophorèse, le gel a été incubé durant 30 minutes dans du tampon (TAE 1x) contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg. ml⁻¹) et photographié sous lumière ultra-violette (GelDoc 2000, gel documentation system, Bio-Rad).

2.4. Le séquençage et l'analyse phylogénique

Les produits de PCR de l'ARNr16S, provenant des différentes souches isolées ont été séquencés par le GATC Biotech AG (Konstanz, Allemagne). Les séquences obtenues ont été comparées à celles disponibles dans la banque de données GenBank à l'aide de BLAST (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) et les bactéries ayant les séquences les plus proches ont été sélectionnées. Les alignements de séquences ont été réalisés en utilisant ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode du plus proche voisin (Neighbour-Joining Method; Saitou & Nei, 1987). Une analyse de bootstrap avec 500 répliquats a été effectuée afin de vérifier la robustesse de l'arbre. Enfin, l'arbre a été tracé à l'aide du programme Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007). Les séquences obtenues sont disponibles auprès de l'EMBL sous les numéros d'accès : FN562398, FN562399, FN562400, FN562401, FN562402, FN562403, FN562404 et FN562405 pour *D. maris* sp. S1, *Stappia* sp. AG2, *Marinobacter* sp. S2, *Nocardioides* sp. S3, *O. alexandrii* sp. AG4, *O. alexandrii* sp. AG7, *Micrococcus* sp. AG10 and *Sphingomonas* sp. AG6, respectivement.

3. Traitements chimiques

3.1. Extraction lipidique

3.1.1. La méthode appliquée sur les échantillons obtenus *in vitro*

Les phases aqueuses obtenues lors des différentes incubations bactériennes ont été extraites aux ultra-sons après ajout de méthanol et de chloroforme ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$; 1:2:0.8, v/v/v). Après extraction (15 min), la séparation des phases a été obtenue après rajout de chloroforme et d'eau distillée ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$; 1:1:0,9, v/v/v). La phase organique a été récupérée et la phase aqueuse extraite deux fois avec du chloroforme. Les trois extraits chloroformiques ont été réunis, séchés sur du Na_2SO_4 anhydre, filtrés et évaporés à sec sous vide.

3.1.2. La méthode appliquée sur les échantillons prélevés *in situ* en mer Méditerranée et dans l'océan Pacifique équatorial

Les filtres ou sédiments lyophilisés ont été extraits au Soxhlet à l'aide d'un mélange dichlorométhane:méthanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 9:1 v/v) durant 8 heures. Après ajout d'une solution de NaCl à 5% et décantation, la phase organique contenant les lipides a été séchée sur du Na_2SO_4 anhydre, puis évaporée à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les échantillons ont été ensuite stockés à -20°C jusqu'à l'analyse.

3.1.3. La méthode appliquée sur les échantillons prélevés *in situ* en Alaska

Les échantillons sédimentaires (≈ 2 g de chaque sédiment) ont été extraits (10 ml, 5x) par un mélange dichlorométhane:méthanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 3:1 v/v) à l'aide d'un extracteur Dionex ASE 200 opérant à 100°C et 1500 psi. Après ajout d'eau désionisée (10 ml), le mélange a été extrait à l'hexane (10 ml, 3x). Les extraits ont été ensuite combinés, lavés avec une solution aqueuse en NaCl saturé à 50% et séchés 12 h sur des granules anhydres de Na_2SO_4 . L'hexane a été ensuite évaporé, puis séché sous un flux d'azote.

3.2. Hydrolyse alcaline

Un mélange d'eau distillée (25 ml), de méthanol (25 ml) et d'hydroxyde de potassium (2,8 g) a été ajouté à l'extrait lipidique obtenu après extraction et l'ensemble a été porté à reflux durant 2 heures. Après refroidissement, le contenu du ballon a été ensuite acidifié avec de l'acide chlorhydrique 2 N (jusqu'à un pH de 1), puis extrait 3 fois avec du dichlorométhane. Les extraits obtenus ont été séchés sur du Na₂SO₄ anhydre, filtrés et évaporés à sec sous vide.

3.3. Hydrolyse acide

Afin d'examiner le contenu en acides gras des sphingolipides de la souche *Sphingomonas* sp.AG6, un traitement supplémentaire (permettant l'hydrolyse des liaisons amides qui résistent à la saponification) a été effectué. Pour cela, le résidu obtenu après hydrolyse alcaline a été traité avec de l'acide chlorhydrique (2 N) à reflux durant 4 heures. Après refroidissement, le mélange réactionnel a été extrait trois fois avec du dichlorométhane. Les extraits obtenus ont ensuite été séchés sur du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), filtrés et évaporés à sec sous vide à 40°C.

3.4. Purification des alcénones

Dans le cas des échantillons prélevés en Alaska, une purification des extraits obtenus après hydrolyse alcaline a été nécessaire, du fait de la co-élution des alcénones avec des éthers de stérol. Cette purification a nécessité une séparation de la fraction "cétone" sur colonne de silice et une adduction à l'urée.

3.4.1. Purification sur colonne

L'extrait lipidique obtenu après hydrolyse alcaline a été déposé sur une colonne de silice (Kieselgel 60, 27 x 1.3 cm) et élué successivement avec de l'hexane (100 ml) et du toluène (150 ml). Si cette séparation a permis de récupérer les alcénones dans l'éluat au toluène et de les séparer des hydrocarbures et des composés plus polaires, elle n'a pas permis de séparer ces dernières des éthers de stérol et il a donc fallu effectuer une purification supplémentaire.

3.4.2. Adduction à l'urée

Le résidu obtenu a été mélangé avec une solution saturée d'urée dans du méthanol et laissée au repos pendant 24 h afin de permettre à l'adduction de se dérouler. Par la suite, les cristaux d'urée ont été rincés plusieurs fois avec de l'éther de pétrole (30/60) et séchés sous un flux d'azote. Les alcénones purifiées ont été récupérées après dissolution des cristaux dans de l'eau distillée et extraits à l'éther de pétrole (30/60).

3.5. Réduction au NaBH_4

Les extraits lipidiques totaux ont été réduits (1 heure) dans un mélange éther diéthylique : méthanol (4:1, v/v, 5 ml) par un excès de NaBH_4 (10 mg/mg d'extrait). Après réduction, une solution de chlorure d'ammonium (10 ml) a été ajoutée afin de détruire le réactif puis le pH a été ajusté à 1 avec de l'acide chlorhydrique (2 N). Le mélange a été agité et extrait 3 fois avec un mélange hexane:chloroforme (4:1, v/v). Les extraits obtenus ont ensuite été séchés comme décrit précédemment et évaporés à sec sous un flux d'azote.

3.6. Hydrogénation

Certains extraits lipidiques totaux réduits ont été hydrogénés (sous une atmosphère de H_2) dans du méthanol avec du Pd/CaCO_3 (5% Pd, 10-20 mg/mg d'extrait, Aldrich) comme catalyseur, pendant 12 heures sous agitation magnétique. Après hydrogénation, le catalyseur a été éliminé par filtration et le filtrat a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif.

3.7. Méthylation

Les extraits lipidiques ont été repris dans 2 ml de méthanol chlorhydrique anhydre (3 N, Supelco) et chauffés à 80°C durant 1 heure. Après refroidissement, de l'eau distillée en excès a été ajoutée et les esters méthyliques ont été extraits trois fois avec un mélange hexane:chloroforme (4:1, v/v), séchés sur du Na_2SO_4 anhydre et évaporés à sec sous vide.

3.8. Formation de pyrrolidides afin de déterminer les positions des doubles liaisons

Les esters méthyliques ainsi obtenus ont été dissous dans 1 ml de pyrrolidine auquel 0,1 ml d'acide acétique a été ajouté. Le mélange a ensuite été chauffé durant 1 heure à 100°C. Les amides ainsi formées ont été reprises dans du dichlorométhane et lavées avec de l'acide chlorhydrique dilué (afin d'éliminer l'excès de pyrrolidine), puis avec de l'eau distillée. La phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄ anhydre, filtrée puis évaporée à sec sous vide.

3.9. Derivatisation

Après l'évaporation des solvants, les résidus ont été récupérés dans 300 µl d'un mélange de pyridine et de N,O-bis(triméthysilyl)trifluoroacetamide pure (BSTFA, Supelco)(2:1, v/v) et incubés pendant 1 heure à 50°C. Après évaporation à sec sous un flux d'azote, les résidus dérivatisés ont été ensuite repris dans une quantité adéquate d'un mélange d'acétate d'éthyle et de BSTFA puis analysés en CPG-SMIE

3.10. Obtention de standards des produits de dégradation des Δ^5 -stérois

Les hydroperoxydes 5 α - et 6 α/β ont été obtenus après oxydation photo-sensibilisée des Δ^5 -stérois correspondants dans de la pyridine et en présence d'haematoporphyrine comme sensibilisateur (Nickon & Bagli, 1961). Le réarrangement allylique des hydroperoxydes 5 α - (en 7 β -) et l'épimérisation de ces derniers en 7 β - ont été effectuées à température ambiante dans du chloroforme (Teng *et al.*, 1973). Ces différents hydroperoxydes ont été ensuite réduits en alcools correspondants par un excès de NaBH₄. Le traitement des Δ^5 -sterols avec de l'acide meta-chloroperoxybenzoïque dans du dichlorométhane anhydre a conduit à la formation d'un mélange d'époxydes 5 α ,6 α - et 5 β ,6 β -.

3.11. Obtention de standards des alcénones

L'extrait lipidique obtenu après extraction et hydrolyse alcaline de 500 mg de cellules d'*E. huxleyi* CS-57 lyophilisées a été chromatographié sur une colonne de silice (Kieselgel 60, 27 x 1.3 cm). Après une élution initiale avec 100 ml d'hexane permettant d'éliminer les

hydrocarbures, trois fractions ont été éluées avec du toluène (3 x 50 ml). La première fraction a été éliminée, alors que 11 mg de méthyle alcénones et 14 mg d'éthyle alcénones ont été obtenues après évaporation de la seconde et de la troisième fraction, respectivement. Ces alcénones ont servi à la fois de standards d'identification et de quantification des alcénones et de substrat lors des expériences de dégradation des alcénones.

3.12. Analyses à l'aide de couplages chromatographe en phase gazeuse-spectromètre de masse travaillant en impact électronique (CPG-SMIE)

3.12.1. Les analyses du contenu en alcénones

Les analyses en CPG-SMIE ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890 couplé à un spectromètre de masse Agilent 5973. L'appareil était équipé d'une colonne capillaire en silice fondue contenant une phase SOLGEL-1 (SGE ; 0,25 μm d'épaisseur de film). La température du four a été programmée de 70°C à 130°C à 20°C.min⁻¹, puis de 130°C à 250°C à 5°C.min⁻¹ et enfin de 250°C à 300°C à 3°C.min⁻¹. La pression de gaz vecteur (He) a été maintenue à 0,69 Bar jusqu'à la fin du programme de température, puis programmée de 0,69 à 1,49 Bar à 0,04 Bar.min⁻¹. La température de l'injecteur (" dans la colonne" équipé d'une pré-colonne en silice désactivée) était de 50°C, l'énergie des électrons de 70 eV, la température de la source de 190°C et le pas de scan de 1,99 cycles.s⁻¹.

3.12.2. Les analyses du contenu en acides gras

Les analyses des acides gras ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse HP 5890 Series II Plus couplé à un spectromètre de masse HP 5972. L'appareil était équipé d'une colonne capillaire en silice fondue contenant une phase apolaire SOLGEL-1 (SGE ; 0,25 μm d'épaisseur de film). La température du four a été programmée de 60°C à 130°C à 20°C.min⁻¹, puis de 130°C à 300°C à 4°C.min⁻¹. La pression de gaz vecteur (He) a été maintenue à 1,04 Bar jusqu'à la fin du programme de température, puis programmée de 1,04 à 1,50 Bar à la vitesse de 0,05 Bar.min⁻¹. La température de l'injecteur (splitless) était de 250°C, l'énergie des électrons de 70 eV, la température de la source de 170°C et le pas de scan de 1,5 cycles.s⁻¹.

3.13. Analyses en chromatographie en phase gazeuse détection en ionisation de flamme (CPG-FID)

Certaines analyses des alcénones ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse-FID HP6890A équipé d'une colonne capillaire en silice fondue VF-1 (60 m x 0.32 mm d.i., 0.25 μm d'épaisseur de film). Un débit constant de gaz vecteur (hydrogène) de 1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a été utilisé et la température du four a été programmée de 100 à 300°C à une vitesse de 5°C min^{-1} .

4. Les différents sites d'études

4.1. La mer Méditerranée

4.1.1. Description du site d'étude

Les échantillons de particules en suspension et de sédiments ont été collectés dans le nord-ouest de la mer Méditerranée (mer Ligure), à 52 km de Nice (43°25' N, 07°52'E, Fig. VIII-1) durant le programme MedFlux (Campagne R/V Tethys II, mai 2006). Le but de ce programme multidisciplinaire visait à déterminer et modéliser les relations entre la matière organique et les ballasts minéraux présents dans le matériel particulaire des océans (Lee *et al.*, 2009a). Le site de Medflux/Dyfamed est caractérisé par de faibles courants horizontaux et par l'absence d'apports terrigènes fluviaux. En fait, le courant Liguro-provençal, qui est généré par une circulation cyclonique permanente des eaux de surface (Bethoux *et al.*, 1986), agit comme une barrière physique en empêchant les apports latéraux.

Les successions phytoplanctoniques dans cette zone ont été bien décrites et consistent généralement en un bloom de printemps suivi d'un bloom d'été aux conditions oligotrophes, (Marty *et al.*, 2002), dont la variabilité temporelle correspondrait au flux des particules (Miquel *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2009b).

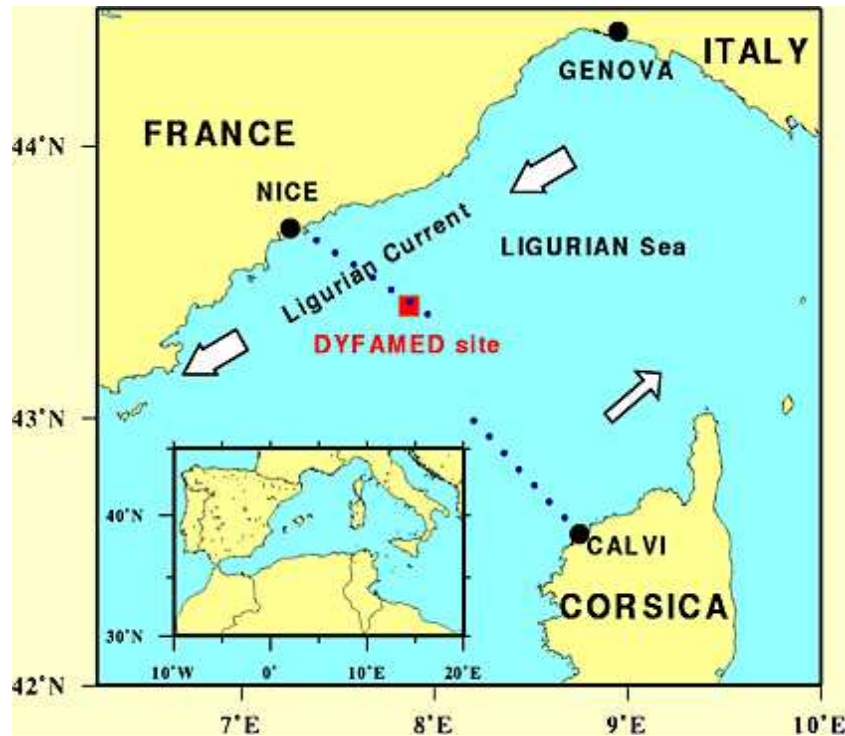


Fig. VIII-1. Carte situant le site Medflux/Dyfamed en mer Méditerranée.

4.1.2. Echantillonnage

Les échantillons de matériel particulaire ont été collectés le 10 mai 2006 en utilisant un système de filtration *in situ* à large volume Challenger (Cochran *et al.*, 2008). L'eau de mer (500-800 l) collectée aux profondeurs de 5, 20, 40, 80, 100, 125, 150, 400 et 800 m a préalablement été filtrée à travers une colonne de 53 μm afin d'éliminer rapidement les grosses particules coulant rapidement. Les particules en suspension ont été collectées sur un filtre en fibres de verre (Whatman type A/E) de 293 mm préalablement pyrolysé (500°C, 6 h) dont la taille des pores était de 0.7 μm . Les filtres GFF ont été coupés en deux et une moitié a été utilisée pour l'analyse des lipides. Le sédiment de surface (0-0.5 cm) a été collecté par carottage (carottier boîte). Les filtres et le sédiment ont été lyophilisés et stockés au froid (-20°C) jusqu'à l'analyse.

Le carbone organique particulaire (POC) a été mesuré après traitement des filtres avec de l'acide chlorhydrique fumant à l'aide d'un analyseur CHN Carlo Erba 1602 CHN. Les concentrations en Chlorophylles ont été obtenues à partir des données de fluorescence (CTD) durant l'échantillonnage.

4.2. L'Alaska

4.2.1. Description du site d'étude

Les échantillons de sédiments ont été collectés dans le nord-est du Golfe de l'Alaska entre 55°N et 61°N couvrant ainsi une large gamme de paramètres océanographiques incluant des eaux côtières et intérieures (Fig. VIII-2).

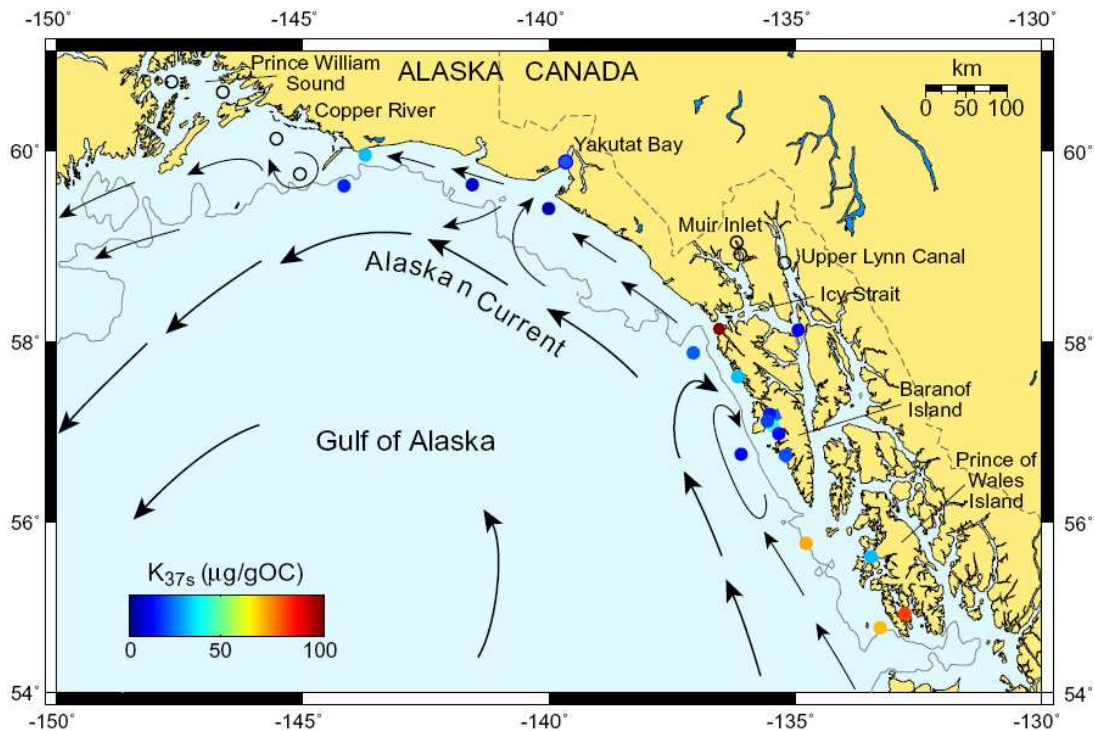


Fig. VIII-2. Carte montrant la localisation des 27 sites d'étude du sud-est de l'Alaska où la surface du sédiment a été obtenue par carottage (Prahl *et al.*, 2010).

Icy Strait (58°N) divise la région en deux zones sédimentaires bien distinctes (Walinsky *et al.*, 2009). La zone du nord est un paysage hautement montagneux avec peu de végétation et reçoit des apports plus importants de matériaux détritiques provenant de cours d'eau drainant de nombreux glaciers. La zone au sud est ponctuée par de grandes îles adjacentes aux pentes très boisées avec relativement peu de glaciers (Milliman & Syvitski, 1992).

Globalement, la région d'étude se caractérise par des conditions de "downwelling" (plongée des eaux de surface) en raison de la circulation cyclonique de l'important courant de l'Alaska (Fig. VIII-2). Néanmoins, une élévation de la production primaire est observée de façon saisonnière dans certaines parties de la région étudiée. L'imagerie satellite SeaWiFs, indique que la moyenne sur cinq périodes d'été (15 juin-30 août, 1998-2002) de la concentration en

chlorophylle est significativement plus importante dans les eaux de surface au sud de Icy Strait, en particulier à proximité des eaux intérieures de Baranof et des îles du prince de Galles (Stabeno *et al.*, 2004).

4.2.2. *Echantillonnage*

Durant l'été 2004, 27 échantillonnages (Fig. VIII-2) ont été effectués à bord du Maurice Ewing (EW0408). Chaque carotte a été découpée dans le sens de la longueur et stockée durant 1 an dans des tubes scellés dans des conditions réfrigérées ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) à l'Oregon State University Core Repository (<http://corelab-www.coas.oregonstate.edu/>). Une fois les échantillons de sédiments de surface (0-1 cm) obtenus, ceux-ci ont été immédiatement lyophilisés et homogénéisés par une agitation vigoureuse dans leurs contenants en verre et, si nécessaire, par un broyage avec une spatule.

4.3. *L'Océan Pacifique équatorial*

4.3.1. *Description du site d'étude*

Les échantillons de particules et de trappes à sédiments ont été collectés dans le Pacifique équatorial entre 0°N et 140°W (Fig. VIII-3).

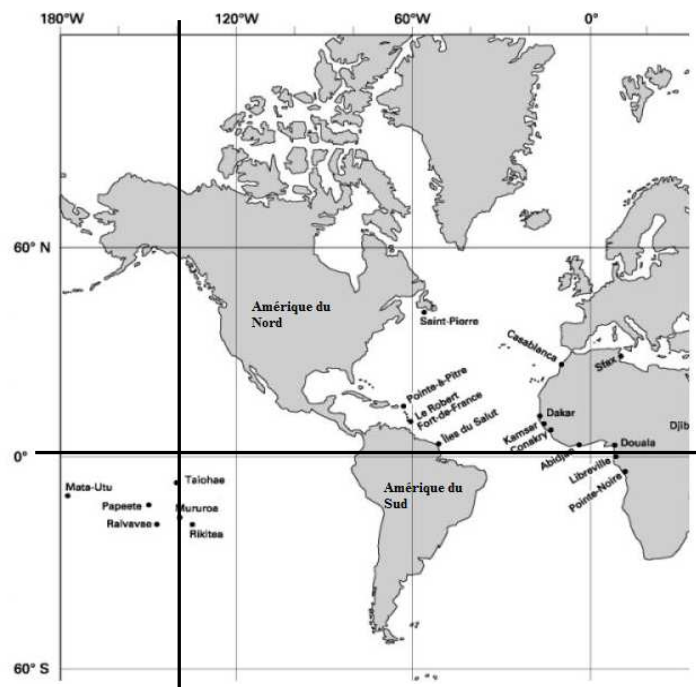


Fig. VIII- 3. Carte situant la zone du Pacifique équatorial étudiée (0°N - 140°W)

4.3.2. *Echantillonnage*

Les échantillons de particules ont été collectés dans le cadre du programme U.S. JGOFS EqPac en 1992. Les particules en suspension ont été prélevées à 8 profondeurs (15-850 m) à l'aide d'un système de filtration *in situ* larges volumes (MULVFS; Bishop *et al.*, 1985) durant la campagne TN011 du R/V *Thomas Thompson* (EqPac survey 2, août - septembre, 1992). Les pompes MULFVS ont filtré 1 000-15 000 l d'eau à travers un crible Nitex de 53- μm , puis les particules en suspension ont été collectées sur deux filtres de porosité 1 μm Microquartz (QMA). Les filtres ont été stockés au froid (-20°C) au laboratoire du Skidaway Institute of Oceanography (Sheridan *et al.*, 2002) jusqu'à l'analyse. Les échantillons de trappes à sédiments ont été collectés à trois profondeurs (105, 955 et 3459 m; Wakeham *et al.*, 1997a). L'échantillon obtenu à la profondeur de 105 m correspond à une durée de prélèvement de 3 jours durant un été sans El-Niño (campagne TN011), alors que les échantillons obtenus à 955 et 3459 m correspondent à une année de flux de particules (janvier 1992 - janvier 1993; Honjo *et al.*, 1999). Après élimination du zooplancton par passage sur un crible de 850 μm , les échantillons ont été partagés afin de permettre les multiples analyses envisagées (composition élémentaire, lipides, sucres, amino- acides, pigments; Hernes *et al.*, 1996; Wakeham *et al.*, 1997a,b; Lee *et al.*, 2000) et filtrés sur des filtres en fibres de verre pré-pyrolysés.

Références bibliographiques

- Abbott, M. R. & Zion, P. M., 1985. Satellite observations of phytoplankton variability during an upwelling event. *Continental Shelf Research*, 4: 661-680.
- Abboudi, M., Mattalana-Surget, S., Rontani, J.-F., Sempéré, R., Joux, F., 2008. Physiological alteration of the marine bacterium *Vibrio angustum* S14 exposed to simulated sunlight during growth. *Current Microbiology*, 57: 412-417.
- Abramson, L., Lee, C., Liu, Z., Szlosek, J., Wakeham, S.G., 2010. Exchange between suspended and sinking particles in the northwest Mediterranean as inferred from the organic composition of *in situ* pump and sediment trap samples. *Limnology and Oceanography*, 55: 725-739.
- Agogué, H., Joux, F., Obernosterer, I., Lebaron, P., 2005. Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5282-5289.
- Alcorn, S.M., Orum, T.V., Steigerwalt, A.G., Foster, J.L.M., Fogleman, J.C., Brenner, D.J., 1991. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 197-212.
- Allard, W.G., Belt, S. T., Masse, G., Naumann, R., Robert, J. M., Rowland, S., 2001. Tetra-unsaturated sesterterpenoids (Haslenes) from *Haslea ostrearia* and related species. *Phytochemistry*, 56: 795-800.
- Allen, J.R. & Ensign, S.A., 1996. Carboxylation of epoxides to beta-keto acids in cell extracts of *Xanthobacter* strain Py2. *Journal of Bacteriology*, 178: 1469-1472.
- Allgaier, M., Riesebell, U., Vogt, M., Thyraug, R., Grossart, H.-P., 2008. Coupling of heterotrophic bacteria to phytoplankton bloom development at different $p\text{CO}_2$ levels: A mesocosm study. *Biogeosciences*, 5: 1007-1022.
- Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Küpper, F.C., Sunda, W.G., Carrano, C.J., 2009. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 17071-17076.
- Andersen, N., Müller, P.J., Kirst, G., Schneider, R.R., 1999. The d^{13}C signal in $\text{C}_{37:2}$ alkenones as a proxy for reconstructing late Quaternary $p\text{CO}_2$ in surface waters from the South Atlantic. In: Proxies in paleoceanography: Examples from the south Atlantic. Fischer, G. & Wefer, G. (Eds). Springer-Verlag, New-York, pp. 469-488.
- Andersson, B.A. & Holman, R.T., 1974. Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids*, 9: 185-190.
- Aries, E., Doumenq, P., Artaud, J., Acquaviva, M., Bertrand, J.-C., 2001. Effects of petroleum hydrocarbons on the phospholipid fatty acid composition of a consortium composed of marine hydrocarbon-degrading bacteria. *Organic Geochemistry*, 32: 891-903.
- Arthur, M.A., Dean, W.E., Claypool, G.E., 1985. Anomalous ^{13}C enrichment in modern marine organic carbon. *Nature*, 315: 216-218.
- Arthur, M.A. & Dean, W.E., 1998. Organic matter production and preservation and evolution of anoxia in the Holocene Black Sea. *Paleoceanography*, 13: 395-411.
- Bacon, M.P., Huh, C.A., Fleer, A.P., Deuser, W.G., 1985. Seasonality in the flux of natural radionuclides and plutonium in the deep Sargasso Sea. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 32: 73-286.

- Bard, E., Rostek, F., Sonzogni, C., 1997. Interhemispheric synchrony of the last deglaciation inferred from alkenone palaeothermometry. *Nature*, 385: 707-710.
- Bard, E., 2001. Comparison of alkenone estimates with other paleotemperature proxies. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 2, doi:10.1029/2000GC000050.
- Barouxis, A., Scribe, P., Dagaut, J., Saliot, A., 1988. Free and bound lipids from equatorial surficial sediments separated as a function of particle size. *Organic Geochemistry*, 13: 773-783.
- Barrett, S.M., Volkman, J.K., Dunstan, G.A., Leroi, J.-M., 1995. Sterols of 14 species of marine diatoms (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 31: 360-369.
- Barth J. A., Cowles T. J., Kosro P. M., Shearman R. K., Huyer A., Smith R. L., 2002. Injection of carbon from the shelf to offshore beneath the euphotic zone in the California Current. *Journal of Geophysical Research*, 107, doi: 10.1029/2001JC000956.
- Bartoli, G., Migon, C., Losno, R., 2005. Atmospheric input of dissolved inorganic phosphorus and silicon to the coastal northwestern Mediterranean Sea: Fluxes, variability and possible impact on phytoplankton dynamics. *Deep-Sea Research I*, 52: 2005-2016
- Baumann, P. & Baumann, L., 1981. The marine gram negative eubacteria: Genera Photobacterium, Beneckae, Alteromonas, Pseudomonas and Alcaligenes. In: The prokaryotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, Vol. 1. Mortimer, P.S., Heinz, S., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds). Springer-Verlag, New-York, pp. 1302-1330.
- Beardall, J., Johnston, A., Raven, J., 1998. Environmental regulation of CO₂ concentrating mechanisms in microalgae. *Canadian Journal of Botany*, 76: 1010-1017.
- Belt, S.T., Cooke, D.A., Hird, S.J., Rowland, S., 1994. Structural determination of a highly branched C₂₅ sedimentary isoprenoid biomarker by NMR-spectroscopy and mass-spectrometry. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 18: 2077-2078.
- Belt, S.T., Cooke, D.A., Robert, J.M., Rowland, S., 1996. Structural characterisation of widespread polyunsaturated isoprenoid biomarkers: A C₂₅ triene, tetraene and pentaene from the diatom *Haslea ostrearia* Simonsen. *Tetrahedron Letters*, 37: 4755-4758.
- Belt, S.T., Allard, W.G., Masse, G., Robert, J.M., Rowland, S.J., 2000. Highly branched isoprenoids (HBIs): Identification of the most common and abundant sedimentary isomers. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64: 3839-3851.
- Belt, S.T., Masse, G., Allard, W.G., Robert, J.M., Rowland, S.J., 2001a. C₂₅ highly branched isoprenoid alkenes in planktonic diatoms of the Pleurosigma genus. *Organic Geochemistry*, 32: 1271-1275.
- Belt, S.T., Masse, G., Allard, W.G., Robert, J.M., Rowland, S.J., 2001b. Identification of a C₂₅ highly branched isoprenoid triene in the freshwater diatom *Navicula sclesvicensis*. *Organic Geochemistry*, 32: 1169-1172.
- Bendle, J., Rosell-Mele, A., Ziveri, P., 2005. Variability of unusual distributions of alkenones in the surface waters of the Nordic seas. *Paleoceanography*, 20, doi:10.1029/2004PA001025.
- Bentaleb, I., Grimalt, J. O., Vidussi, F., Marty, J. C., Martin, V., Denis, M., Hatte, C., Fontugne, M., 1999. The C₃₇ alkenone record of seawater temperature during seasonal thermocline stratification. *Marine Chemistry*, 64: 301-313.

- Benthien, A. & Müller, P.J., 2000. Anomalously low alkenone temperatures caused by lateral particle and sediment transport in the Malvinas Current region, western Argentine Basin. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 47: 2369-2393.
- Berger, W.H., 1970. Planktonic foraminifera: selective solution and lysocline. *Marine Geology*, 8: 111-138.
- Berland, B.R., Bonin, D.J., Maestrini, S.Y., 1972. Are some bacteria toxic for marine algae? *Marine Biology*, 12: 189-193.
- Bethoux, N., Massinon, B., Montagner, J.-P., Petit, F., Rehault, J.-P., 1986. Several location methods for underwater shots in the Gulf of Genoa (western Mediterranean): Structural implications. *Tectonophysics*, 128: 357-379.
- Beutner, S., Bloedorn, B., Hoffman, T., Martin, H.D., 2000. Synthetic singlet oxygen quenchers. In: *Methods in enzymology*, vol. 319. Packer, L. & Sies, H. (Eds). Academic press, New-York, pp. 226-241.
- Bidigare, R.R., Hanson, K. L., Buesseler, K. O., Wakeham, S. G., Freeman, K. H., Pancost, R. D., Millero, F. J., Steinberg, P., Popp, B. N., Latasa, M., Landry, M. R., Laws, E. A., 1999. Iron stimulated changes in ^{13}C fractionation and export by equatorial Pacific phytoplankton: Toward a paleogrowth rate proxy. *Paleoceanography*, 14: 589-595.
- Bishop, J.K.B., Schupack, D., Sherrell, R.M., Conte, M., 1985. A multiple unit large volume *in situ* filtration system for sampling oceanic particulate matter in mesoscale environments. In: *Mapping strategies in chemical oceanography*. Zirino, A. (ed). American Chemical Society, Washington, pp. 155-175.
- Blanz, T., Emeis, K.C., Siegel, H., 2005. Controls on alkenone unsaturation ratios along the salinity gradient between the open ocean and the Baltic Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69: 3589-3600.
- Bonin, P.C., Michotey V.D., Mouzdahir A., Rontani J.-F., 2002. Anaerobic biodegradation of squalene: Using DGGE to monitor the isolation of denitrifying bacteria taken from enrichment cultures. *Fems Microbiology Ecology*, 42: 37-49.
- Boon, J.J.V.D., Meer, F.W., Schuyl, P.J.W., de Leeuw, J. W., Schenck, P.A., Burlingame, A.L., 1978. Organic geochemical analysis of core samples from site 362 Walvis Ridge, DSDP leg 40. In: *Initial reports of the deep sea drilling project*. Bolli, H.M. & Ryan, W.B.F. (Eds). U.S. Government printing office, Washington, pp. 627-637.
- Bortolomeazzi, R., De Zan, M., Pizzale, L., Conte, L.S., 1999. Mass spectrometry characterization of the 5α , 7α , and 7β -hydroxy derivatives of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol and brassicasterol. *Journal of the Agricultural Food Chemistry*, 47: 3069-3074.
- Bradley, R.S., 1999. Paleoclimatic reconstruction. In: *Paleoclimatology: Reconstructing climates of the Quaternary*. Dmowska, R. & Holton, J.R. (Eds). Academic press, San Diego, pp. 1-10.
- Brassell, S.C., Eglinton, G., Marlowe, I.T., Pflaumann, U., Sarnthein, M., 1986. Molecular stratigraphy : A new tool for climatic assessment. *Nature*, 320: 129-133.
- Brassell, S.C., 1992. Biomarkers in sediments, sedimentary rocks and petroleum: Biological origins, geological fate and applications. In: *Geochemistry of organic matter in sediments and*

- sedimentary rocks. Pratt, L.M., Comer, J.B. & Brassell, S.C. (Eds). SEPM Short Course, Oklahoma, pp. 29-72.
- Brassell, S.C., 1993. Applications of biomarkers for delineating marine paleoclimatic fluctuations during the Pleistocene. In: Organic geochemistry, principles and applications. Engel, M.H. & Macko, S.A. (Eds). Plenum Press, New-York, pp. 699-738.
- Brassell, S.C., Dumitrescu, M., Party, O.L.S.S., 2004. Recognition of alkenones in a lower Aptian porcellanite from the west central Pacific. *Organic Geochemistry*, 35: 181-188.
- Brennan, P.J., 1988. *Mycobacterium* and other actinomycetes. In: Microbial lipids, vol. 1. Ratledge, C. & Wilkinson, S.G. (Eds). Academic Press, London, pp. 203-298.
- Britton, L.N., Brand, J.M., Markovetz, A.J., 1974. Source of oxygen in the conversion of 2-tridecanone to undecyl acetate by *Pseudomonas cepacia* and *Nocardia* sp. *Biochimica et Biophysica Acta*, 369: 45-49.
- Brown, C.W. & Yoder, J.A., 1994. Coccolithophorid blooms in the global Ocean. *Journal of Geophysical Research Oceans*, 99: 7467-7482.
- Bukry, D., 1974. Coccoliths as paleosalinity indicators: Evidence from the Black Sea. In: The Black Sea: Geology, chemistry and biology. Degens, E.T. & Ross, D.A. (Eds). American Association of Petroleum Geologists, Oklahoma, pp. 353-362.
- Burkhardt, S., Riebesell, U., Zondervan, I., 1999. Effects of growth rate, CO₂ concentration, and cell size on the stable carbon isotope fractionation in marine phytoplankton. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63: 3729-3741.
- Busse, H.J., Kämpfer, P., Denner, E.B.M., 1999. Chemotaxonomic characterization of *Sphingomonas*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 242-251.
- Bykova, S.A., Zvyagintseva, I.S., Akhlynin, D.S., Belyaev, S.S., Gal'chenko, V.F., 2000. Clusterization of halophilic and halotolerant eubacteria using whole-cell protein electrophoresis data. *Microbiology*, 69: 582-587.
- Cacho, I., Grimalt, J. O., Pelejero, C., Canals, M., Sierro, F. J., Flores, J. A., Shackleton, N., 1999a. Dansgaard-Oeschger and heinrich event imprints in Alboran Sea paleotemperatures. *Paleoceanography*, 14: 698-705.
- Cacho, I., Pelejero, C., Grimalt, J.O., Calafat, A., Canals, M., 1999b. C₃₇ alkenone measurements of sea surface temperature in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Organic Geochemistry*, 30: 557-566.
- Caldwell, D.E., 1977. The planktonic microflora of lakes. *Critical Reviews in Microbiology*, 5: 305-370.
- Cayre, O. & Bard, E., 1999. Planktonic foraminiferal and alkenone records of the last deglaciation from the Eastern Arabian Sea. *Quaternary Research*, 52: 337-342.
- Cerniglia, C.E., Perry, J.J., 1975. Metabolism of *n*-propylamine, isopropylamine and 1,3-propanediamine by *Mycobacterium convolutum*. *Journal of Bacteriology*, 124: 285-290.

- Chaler, R., Villanueva, J., Grimalt, J.O., 2003. Non-linear effects in the determination of paleotemperature $U_{37}^{K'}$ alkenone ratios by chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1012: 87-93.
- Christie, W. W., 2003. Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids (Third Edition). The Oily Press.
- Christodoulou, S., Marty, J.C., Miquel, J.C., Volkman, J.K., Rontani, J.-F., 2009. Use of lipids and their degradation products as biomarkers for carbon cycling in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 113: 25-40.
- Christodoulou, S., Joux, F., Marty, J.C., Sempéré, R., Rontani, J.-F., 2010. Comparative study of UV and visible light induced degradation of lipids in non-axenic senescent cells of *Emiliania huxleyi*. *Marine Chemistry*, 119: 139-152.
- Chu, G.Q., Sun, Q., Li, S. Q., Zheng, M. P., Jia, X. X., Lu, C. F., Liu, J. Q., Liu, T. S., 2005. Long-chain alkenone distributions and temperature dependence in lacustrine surface sediments from China. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69: 4985-5003.
- Coale, K. H. & Bruland, K. W., 1987. Oceanic stratified euphotic zone as elucidated by ^{234}Th : ^{238}U disequilibria. *Limnology and Oceanography*, 32: 189-200.
- Cochran, J.K., Miquel, J-C., Fowler, S., Gasser, B., Hirschberg, D., Szlosek, J., Rodriguez y Baena, A.M., Armstrong, R., Stewart, G., Masqué, P., 2008. Time-series measurements of ^{234}Th in water column and sediment trap samples from the northwestern Mediterranean. *Deep-Sea Research Part II, Tropical Studies in Oceanography*, 56: 1487-1501.
- Cole, J.J., 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 13: 291-314.
- Colquhoun, J.A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 74: 27-40.
- Colquhoun, J.A., Zulu, J., Goodfellow, M., Horikoshi, K., Ward, A.C., Bull, A.T., 2000. Rapid characterisation of deep-sea actinomycetes for biotechnology screening programmes. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 77: 359-367.
- Conte, M.H., Eglinton, G., Madureira, L.A.S., 1992. Long-chain alkenones and alkyl alkenoates as paleotemperature indicators : Their production, flux and early sedimentary diagenesis in the eastern-north Atlantic. *Organic Geochemistry*, 19: 287-298.
- Conte, M.H. & Eglinton, G., 1993. Alkenone and alkenoate distributions within the euphotic zone of the eastern-north Atlantic : Correlation with production temperature. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 40: 1935-1961.
- Conte, M.H., Thompson, A., Eglinton, G., Green, J.C., 1995. Lipid biomarker diversity in the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) and the related species *Gephyrocapsa oceanica*. *Journal of Phycology*, 31: 272-282.
- Conte, M.H., Thompson, A., Lesley, D., Harris, R.P., 1998. Genetic and physiological influences on the alkenone/alkenoate versus growth temperature relationship in *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62: 51-68.

- Conte, M.H., Weber, J.C., King, L.L., Wakeham, S.G., 2001. The alkenone temperature signal in western north Atlantic surface waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65: 4275-4287.
- Conte, M.H., Sicre, M. A., Ruhlemann, C., Weber, J. C., Schulte, S., Schulz-Bull, D., Blanz, T., 2006. Global temperature calibration of the alkenone unsaturation index $U_{37}^{K'}$ in surface waters and comparison with surface sediments. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 7, doi:10.1029/2005GC001054.
- Coolen, M.J.L., Muyzer, G., Rijpstra, W. I. C., Schouten, S., Volkman, J. K., Damste, J. S. S., 2004. Combined DNA and lipid analyses of sediments reveal changes in Holocene haptophyte and diatom populations in an Antarctic lake. *Earth and Planetary Science Letters*, 223: 225-239.
- Coolen, M.J.L., Saenz, J. P., Giosan, L., Trowbridge, N. Y., Dimitrov, P., Dimitrov, D., Eglinton, T. I., 2009. DNA and lipid molecular stratigraphic records of haptophyte succession in the Black Sea during the Holocene. *Earth and Planetary Science Letters*, 284: 610-621.
- Couderc, F., 1995. Gas chromatography/tandem mass spectrometry as an analytical tool for the identification of fatty acids. *Lipids*, 30: 691-699.
- Cranwell, P.A., 1973. Branched-chain and cyclopropanoid acids in a recent sediment. *Chemical Geology*, 11: 307-313.
- Cranwell, P.A., 1978. Extractable and bound lipids components in a freshwater sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42: 1523-1532.
- Cranwell, P.A., 1985. Long-chain unsaturated ketones in recent lacustrine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49: 1545-1551.
- Cranwell, P.A., Creighton, M.E., Jaworski, G.H.M., 1988. Lipids of 4 species of fresh-water Chrysophytes. *Phytochemistry*, 27: 1053-1059.
- Cuny, P., Romano, J.-C., Beker, B., Rontani, J.-F., 1999. Comparison of the photo degradation rates of chlorophyll chlorin ring and phytol side chain in phytodetritus: Is the phytyldiol versus phytol ratio (CPPI) a new biogeochemical index? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 237: 271-290.
- Cuny, P. & Rontani, J.-F., 1999. On the widespread occurrence of 3-methylidene-7,11,15-trimethylhexadecan-1,2-diol in the marine environment: A specific isoprenoid marker of chlorophyll photodegradation. *Marine Chemistry*, 65: 155-165.
- Cuny, P., Marty, J.-C., Chiaverini, J., Vescovali, I., Raphel, D., Rontani, J.-F., 2002. One-year seasonal survey of the chlorophyll photodegradation process in the northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 49: 1987-2005.
- Dahl, T.A., Midden, W.R., Hartman, P.E., 1989. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology*, 171: 2188-2194.
- Dastager, S.G., Lee, J.-C., Ju, Y.-J., Park, D.-J., Kim, C.-J., 2008. *Nocardioides tritolerans* sp. nov., isolated from soil in Bigeum Island, Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 1203-1206.

- de Leeuw, J.W., van der Meer, J.W., Rijpstra, W.I.C., Schenck, P.A., 1980. On the occurrence and structural identification of long chain ketones and hydrocarbons in sediments. In: Advances in organic geochemistry. Douglas, A.G. & Maxwell, J.R. (Eds). Pergamon Press, Oxford, pp. 211-217.
- de Leeuw, J.W. & Baas, M., 1986. Early stage diagenesis of steroids. In: Biological markers of the sedimentary record. Johns, R.B. (Ed). Elsevier, Amsterdam, pp. 101-123.
- Doose, H., Prahl, F. G., Lyle, M. W., 1997. Biomarker temperature estimates for modern and last glacial surface waters of the California Current system between 33° and 42°N. *Paleoceanography*, 12: 615-622.
- Doumenq, P., Aries, E., Asia, L., Acquaviva, M., Artaud, J., Gilewicz, M., Mille, G., Bertrand, J.-C., 2001. Influence of *n*-alkanes and petroleum on fatty acid composition of a hydrocarbon-degrading bacterium: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain 617. *Chemosphere*, 44: 519-528.
- Duetz, W.A., Bouwmeester, H., van Beilen, J.B., Witholt, B., 2003. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 269-277.
- Durrieu de Madron, X., Nyffeler, F., Godet, C. H., 1990. Hydrographic structure and nepheloid spatial distribution in the Gulf of Lions continental margin. *Continental Shelf Research*, 10: 915-929.
- Eglinton, G., Bradshaw, S. A., Rosell-Melé, A., Sarnthein, M., Pflaumann, U., Tiedemann, R., 1992. Molecular record of secular sea surface temperature: Changes on 100-year timescales for Glacial Termination-I, Termination-II and Termination-IV. *Nature*, 356: 423-426.
- Eltgroth, M.L., Watwood, R.L., Wolfe, G.V., 2005. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliana huxleyi*. *Journal of Phycology*, 41: 1000-1009.
- Emmanuel, B., 1978. The relative contribution of propionate and long-chain even-numbered fatty acids to the production of long-chain odd-numbered fatty acids in rumen bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 528: 239-246.
- Englebrecht, A.C. & Sachs, J.P., 2005. Determination of sediment provenance at drift sites using hydrogen isotopes and unsaturation ratios in alkenones. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69: 4253-4265.
- Epstein, B.L., D'Hondt, S., Quinn, J.G., Zhang, J.P., Hargraves, P.E., 1998. An effect of dissolved nutrient concentrations on alkenone based temperature estimates. *Paleoceanography*, 13: 122-126.
- Epstein, B.L., D'Hondt, S., Hargraves, P.E., 2001. The possible metabolic role of C₃₇ alkenones in *Emiliana huxleyi*. *Organic Geochemistry*, 32: 867-875.
- Fang, J., Shizuka, A., Kato, C., Schouten, S., 2006. Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rDNA and lipid analyses. *FEMS Microbiology Ecology*, 57: 429-441.
- Farrimond, P., Eglinton, G., Brassell, S.C., 1986. Alkenones in Cretaceous black shales, Blake Bahama Basin, western north Atlantic. *Organic Geochemistry*, 10: 897-903.

- Farrimond, P., Poynter, J.G., Eglinton, G., 1990. A molecular stratigraphic study of Peru Margin Sediments, Hole 686B, LEG 112. *Proceedings of the Ocean Drilling Program Scientific Result*, 112: 547-553.
- Ferchichi, M., Hemme, D., Nardi, M., 1986. Induction of methanethiol production by *Brevibacterium Linens* Cnrz 918. *Journal of General Microbiology*, 132: 3075-3082.
- Fernandez, E., Balch, W.M., Maranon, E., Holligan, P.M., 1994. High rates of lipid biosynthesis in cultured, mesocosm and coastal populations of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Marine Ecology Progress Series*, 114: 13-22.
- Ferreri, C., Samadi, A., Sassatelli, F., Landi, L., Chatgililoglu, C., 2004. Regioselective *cis/trans* isomerization of arachidonic double bonds by thiyl radicals: The influence of phospholipid supramolecular organization. *Journal of the American Chemical Society*, 126: 1063-1072.
- Ficken, K.J. & Farrimond, P., 1995. Sedimentary lipid geochemistry of Framvaren: Impacts of a changing environment. *Marine Chemistry*, 51: 31-43.
- Flügge, A., 1996. Diagenetic degradation of long-chain alkenones: implications for $U_{37}^{K'}$ paleothermometry. *Journal of Conference Abstracts*, 1: 171.
- Foote, C.S., 1976. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. In: Free radicals in biology, 2. Pryor, W.A. (Ed). Academic Press, New-York, pp. 85-133.
- Francois, R., Altabet, M. A., Goericke, R., Mccorkle, D. C., Brunet, C., Poisson, A., 1993. Changes in the delta-¹³C of surface water particulate organic matter across the subtropical convergence in the SW Indian Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 7: 627-644.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., Bessler, T.R., 1979. Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: V. photosensitized oxidation. *Lipids*, 14: 961-967.
- Frankel, E.N., Garwood, R.F., Khambay, B.P.S., Moss, G.P., Weedon, B.C.L., 1984. Stereochemistry of olefin and fatty acid oxidation 3. The allylic hydroperoxides from the autoxidation of methyl oleate. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*: 2233-2240.
- Frankel, E.N., 1998. Lipid oxidation. The Oily Press, Dundee.
- Freeman, K.H. & Hayes, J.M., 1992. Fractionation of carbon isotopes by phytoplankton and estimates of ancient CO₂ levels. *Global Biogeochemical Cycles*, 6: 185-98.
- Freeman, K.H. & Wakeham, S.G., 1992. Variations in the distributions and isotopic compositions of alkenones in Black Sea particles and sediments. *Organic Geochemistry*, 19: 277-285.
- Frimer, A.A., 1979. Reaction of singlet oxygen with olefins: The question of mechanism. *Chemical Reviews*, 79: 359-387.
- Fujine, K., Yamamoto, M., Tada, R., Kido, Y., 2006. A salinity related occurrence of a novel alkenone and alkenoate in Late Pleistocene sediments from the Japan Sea. *Organic Geochemistry*, 37: 1074-1084.
- Gagosian, R.B., Peltzer, E.T., Zafiriou, O.C., 1981. Atmospheric transport of continentally derived lipids to the tropical north Pacific. *Nature*, 291: 312-314.

- Gagosian, R.B., Smith, S.O., Nigrelli, G.E., 1982a. Vertical transport of steroid alcohols and ketones measured in a sediment trap experiment in the equatorial Atlantic Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46: 1163-1172.
- Gagosian, R.B., Zafiriou, O.C., Peltzer, E.T., Alford, J.B., 1982b. Lipids in aerosols from the tropical North Pacific: Temporal variability. *Journal of Geophysical Research*, 87: 11133-11144.
- Gagosian, R.B. & Peltzer, E.T., 1986. The origin of atmospheric input of terrestrial organic material in deep sea sediments. *Organic Geochemistry*, 10: 661-669.
- Garcia-Pichel, F., 1994. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography*, 39: 1704-1717.
- Gillan, F.T., Nichols, P.D., Johns, R.B., Bavor, H.J., 1983. Phytol degradation by marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1423-1428.
- Girotti, A.W., 2001. Photosensitized oxidation of membrane lipids: Reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 63: 103-113.
- Gong, C. & Hollander, D.J., 1999. Evidence for differential degradation of alkenones under contrasting bottom water oxygen conditions: Implication for paleotemperature reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63: 405-411.
- Goni, M.A., Hartz, D.M., Thunell, R.C., Tappa, E., 2001. Oceanographic considerations for the application of the alkenone based paleotemperature $U_{37}^{K'}$ index in the Gulf of California. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65: 545-557.
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R., 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3272-3282.
- Gonzalez, J.M. & Moran, M.A., 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4237-4242.
- Goossens, H., Düren, R.R., de Leeuw, J.W., Schenck, P.A., 1989. Lipids and their mode of occurrence in bacteria and sediments. II: Lipids in the sediment of a stratified freshwater lake. *Organic Geochemistry*, 14: 27-41.
- Gowing, M.M. & Silver, M.W., 1983. Origins and microenvironments of bacteria mediating fecal pellet decomposition. *Marine Biology*, 73:1-16.
- Grice, K., Breteler, W. C. M. K., Schouten, S., Grossi, V., de Leeuw, J. W., Damste, J. S. S., 1998. Effects of zooplankton herbivory on biomarker proxy records. *Paleoceanography*, 13: 686-693.
- Grimalt, J.O., Dewit, R., Teixidor, P., Albaigés, J., 1992. Lipid biogeochemistry of *Phormidium* and *Microcoleus* mats. *Organic Geochemistry*, 19: 509-530.
- Grimalt, J.O., Calvo, E., Pelejero, C., 2001. Sea surface paleotemperature errors in $U_{37}^{K'}$ estimation due to alkenone measurements near the limit of detection. *Paleoceanography*, 16: 226-232.

- Grossi, V., Beker, B., Geenevasen, J. A. J., Schouten, S., Raphel, D., Fontaine, M. F., Damste, J. S. S., 2004. C₂₅ highly branched isoprenoid alkenes from the marine benthic diatom *Pleurosigma strigosum*. *Phytochemistry*, 65: 3049-3055.
- Guieu, C., Bozec, Y., Blain, S., Ridame, C., Sarthou, G., Leblond, N., 2002. Impact of high Saharan dust inputs on dissolved iron concentrations in the Mediterranean Sea. *Geophysical Research Letters*, 29: 1911.
- Guillard, R.R.L. & Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229-239.
- Halliwell, B., 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44: 327-340.
- Harada, N., Handa, N., Harada, K., Matsuoka, H., 2001. Alkenones and particulate fluxes in sediment traps from the central equatorial Pacific. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 48: 891-907.
- Harada, N., Shin, K.H., Murata, A., Uchida, M., Nakatani, T., 2003. Characteristics of alkenones synthesized by a bloom of *Emiliana huxleyi* in the Bering Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67: 1507-1519.
- Harada, N., Sato, M., Shiraishi, A., Honda, M., 2006. Characteristics of alkenone distributions in suspended and sinking particles in the northwestern North Pacific. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70:2045-2062.
- Hartmans, S., Debont, J.A.M., Harder, W., 1989a. Microbial metabolism of short-chain unsaturated hydrocarbons. *Fems Microbiology Reviews*, 63: 235-264.
- Hartmans, S., Smits, J.P., Vanderwerf, M.J., Volkering, F., Debont, J.A.M., 1989b. Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene degrading *Xanthobacter* Strain 124x. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2850-2855.
- Harvey, H.R., Eglinton, G., Ohara, S.C.M., Corner, E.D.S., 1987. Biotransformation and assimilation of dietary lipids by *Calanus* feeding on a dinoflagellate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51: 3031-3040.
- Harvey, R.H. & Macko, S.A., 1997. Catalysts or contributors? Tracking bacterial mediation of early diagenesis in the marine water column. *Organic Geochemistry*, 26: 531-544.
- Harvey, H.R., 2000. Alteration processes of alkenones and related lipids in water columns and sediments, *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 1, doi:10.1029/2000GC000054.
- Harwood, J.L. & Russell, N.L., 1984. Lipids in plants and microbes. Allen, G. & Unwin (eds). London, 162 pp.
- Haug, G. H., Ganopolski, A., Sigman, D. M., Rosell-Melé, A., Swann, G. E. A., Tiedemann, R., Jaccard, S. L., Bollmann, J., Maslin, M. A., Leng, M. J., Eglinton, G., 2005. North Pacific seasonality and the glaciation of North America 2.7 million years ago. *Nature*, 433: 821-825.
- Hecht, A., 1976. The oxygen isotope record of foraminifera in deep sea sediments. In: Foraminifera. Hedley, R.H. & Adams, C.G. (Eds). Academic Press, New York, pp. 1-43.
- Hedges, J.I. & Keil, R.G., 1995. Sedimentary organic matter preservation: An assessment and speculative synthesis. *Marine Chemistry*, 49: 81-115.

- Hedges, J.I., Baldock, J.A., Gelinas, Y., Lee, C., Peterson, M.L., Wakeham, S.G., 2001. Evidence for non-selective preservation of organic matter in sinking marine particles. *Nature*, 409:801-804.
- Hefter, J., 2008. Analysis of alkenone unsaturation indices with fast gas chromatography time of flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80: 2161-2170.
- Herbert, T. D., Schuffert, J. D., Thomas, D., Lange, C., Weinheimer, A., Peleo-Alampay, A., Herguera, J.-C., 1998. Depth and seasonality of alkenone production along the California margin inferred from a core-top transect. *Paleoceanography*, 13: 263-271.
- Herbert, T. D., Schuffert, J. D., Andreasen, D., Heusser, L., Lyle, M., Mix, A., Ravelo, A. C., Stott, L. D., Herguera, J. C., 2001. Collapse of the California Current during glacial maxima linked to climate change on land. *Science*, 293:71-76.
- Herbert, T.D., 2003. Alkenone paleotemperature determination. In: Treatise in marine geochemistry. Elderfield, H. & Turekian, K.K. (Eds). Elsevier, Providence, pp. 391-432.
- Hernes, P.J., Hedges, J.I., Peterson, M.L., Wakeham, S.G., Lee, C., 1996. Neutral carbohydrate geochemistry of particulate matter in the central equatorial Pacific. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 43: 1181-1204.
- Hickey, B. M., 1979. The California Current system: Hypothesis and facts. *Progress in Oceanography*, 8: 191-271.
- Hill, P.S., 1998. Controls on floc size in the sea. *Oceanography*, 11: 13-18.
- Hoefs, M.J.L., Versteegh, G.J.M., Rijpstra, W.I.C., de Leeuw, J.W., Damste, J.S.S., 1998. Postdepositional oxic degradation of alkenones: Implications for the measurement of palaeo sea surface temperatures. *Paleoceanography*, 13: 42-49.
- Honjo, S. & Okada, H., 1974. Community structure of Coccolithophores in the photic layer of the mid-Pacific. *Micropaleontology*, 20: 209-230.
- Honjo, S., Dymond, J., Prell, W., Ittekkot, V., 1999. Monsoon controlled export fluxes to the interior of the Arabian Sea. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 46: 1859–1902.
- Houghton, S.D. & Guptha, M.V.S., 1991. Monsoonal and fertility controls on recent marginal sea and continental shelf coccolith assemblages from the western Pacific and northern Indian Oceans. *Marine Geology*, 97: 251-259.
- Hung, J.G.C. & Walker, R.W., 1970. Unsaturated fatty acids of mycobacteria. *Lipids*, 5: 720-722.
- Hurst, J.R., Wilson, S.L., Schuster, G.B., 1985. The ene reaction of singlet oxygen: Kinetic and product evidence in support of a peroxide intermediate. *Tetrahedron*, 41: 2191-2197.
- Imbrie, J. & Kipp, N.G., 1971. A new micropaleontological method for quantitative paleoclimatology: Application to late Pleistocene Caribbean core V28-238. In: The late Cenozoic glacial ages. Turekian, K.K. (Ed). Yale University, New Haven, pp. 77-181.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K. H., Horikoshi, K., 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the sea of Okhotsk. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 7224-7235.

- Ishida, Y., 1996. Years of research on dimethylsulfoniopropionate. In: Biological and environmental chemistry of DMSP and related sulfonium compounds. Kiene, R.P., Vissler, P.T., Keller, M.D., Kirst, G.O. (Eds). Plenum Press, New-York, pp. 1-12.
- Ishiwatari, R., Houtatsu, M., Okada, H., 2001. Alkenone sea surface temperatures in the Japan Sea over the past 36 kyr: Warm temperatures at the last glacial maximum. *Organic Geochemistry*, 32: 57-67.
- Jaraula, C.M.B., Brassell, S.C., Morgan-Kiss, R.M., Doran, P.T., Kenig, F., 2010. Origin and tentative identification of tri to pentaunsaturated ketones in sediments from lake Fryxell, East Antarctica. *Organic Geochemistry*, 41: 386-397.
- Jasper, J.P. & Hayes, J.M., 1990. A carbon isotope record of CO₂ levels during the late Quaternary. *Nature*, 347: 462-464.
- Jasper, J.P., Hayes, J.M., Mix, A.C., Prahl, F.G., 1994. Photosynthetic fractionation of ¹³C and concentrations of dissolved CO₂ in the central equatorial Pacific during the last 255,000 years. *Paleoceanography*, 9: 781-798.
- Jeffrey, S.W. & LeRoi, J.M., 1997. Simple procedures for growing SCOR reference microalgal cultures. In: Phytoplankton pigments in oceanography: Monographs on oceanographic methodology. Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (eds). UNESCO, France, pp. 181-205.
- Johansson, P., Unge, T., Cronin, A., Arand, M., Bergfors, T., Jones, T. A., Mowbray, S. L., 2005. Structure of an atypical epoxide hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* gives insights into its function. *Journal of Molecular Biology*, 351: 1048-1056.
- Johns, L., Wraige, E. J., Belt, S. T., Lewis, C. A., Masse, G., Robert, J. M., Rowland, S. J., 1999. Identification of a C₂₅ highly branched isoprenoid (HBI) diene in Antarctic sediments, Antarctic sea-ice diatoms and cultured diatoms. *Organic Geochemistry*, 30: 1471-1475.
- Kaczmarek, L. & Frywell, G.A., 1995. Micro-phytoplankton of the equatorial Pacific 140°W meridional transect during the 1992 El-Niño. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 42: 535-548.
- Kamimura, K., Fuse, H., Takimura, O., Yamaoka, Y., Ohwada, K., Hashimoto, J., 1992. Pressure-induced alteration in fatty acid composition of barotolerant deep-sea bacterium. *Journal of Oceanography*, 48: 93-104.
- Kaneda, T., 1991. *Iso*- and *anteiso*-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*, 55: 288-302.
- Karl, D.M. & Knauer, G.A., 1984. Vertical distribution, transport and exchange of carbon in the northeast Pacific Ocean: Evidence for multiple zones of biological activity. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 31: 221-243.
- Keil, R.G. & Hedges, J.I., 1993. Sorption of organic matter to mineral surfaces and the preservation of organic matter in coastal marine sediments. *Chemical Geology*, 107: 385-388.
- Keller, M.D., Bellows, W.K., Guillard, R.R.L., 1989. Dimethyl sulfide production in marine phytoplankton: Biogenic sulfur in the environment. 194th Meeting of the American Chemical Society, New Orleans, pp. 167-182.

- Kennedy, J.A. & Brassell, S.C., 1992. Molecular stratigraphy of the Santa Barbara Basin: Comparison with historical records of annual climate change. *Organic Geochemistry*, 19: 235-244.
- Kerger, B.D., Nichols, P.D., Antworth, C.P., Sand, W., Bock, E., Cox, J.C., Langworthy, T.A., White, D.C., 1986. Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacillus* spp.: Methoxy, cyclopropyl, α -hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology*, 38: 67-77.
- Kessler, W.S. & McPhaden, M.J., 1995. The 1991–1993 El Niño in the central Pacific. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 42: 295-333.
- Khashe, S. & Janda, J.M., 1998. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 783-787.
- Kiene, R.P. & Visscher, P.T., 1987. Production and fate of methylated sulfur compounds from methionine and dimethylsulfoniopropionate in anoxic salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2426-2434.
- Kiene, R.P. & Taylor, B.F., 1988. Demethylation of dimethylsulfoniopropionate and production of thiols in anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2208-2212.
- Kim, B.-C., Park, J.-R., Bae, J.-W., Rhee, S.-K., Kim, K.-H., Oh, J.-W., Park, Y.-H., 2006. *Stappia marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 75-79.
- Kim, J.H., Huguet, C., Zonneveld, K. A. F., Versteegh, G. J. M., Roeder, W., Damste, J. S. S., Schouten, S., 2009. An experimental field study to test the stability of lipids used for the TEX₈₆ and $U_{37}^{K'}$ palaeothermometers. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73: 2888-2898.
- Klok, J., Baas, M., Cox, H.C., de Leeuw, J.W., Rijpstra, W.I.C., Schenck, P.A., 1988. The mode of occurrence of lipids in a Namibian Shelf diatomaceous ooze with emphasis on the β -hydroxy fatty acids. *Organic Geochemistry*, 12: 75-80.
- Klug, M.J. & Markovetz, A.J., 1968. Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. 3: Oxidative intermediates from 1-hexadecene and 1-heptadecene by *Candida lipolytica*. *Journal of bacteriology*, 96: 1115-1123.
- Knoblauch, C., Sahm, K., Jorgensen, B.B., 1999. Psychrophilic sulfate-reducing bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: Description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov. and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49: 1631-1643.
- Knox, J.P. & Dodge, A.D., 1985. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry*, 24: 889-896.
- Korytowski, W., Bachowski, G.J., Girotti, A.W., 1992. Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: Comparison of the 5 α - and 6 β -hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy. *Photochemistry and Photobiology*, 56: 1-8.
- Kulig, M.J. & Smith, L.L., 1973. Sterol metabolism XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. *Journal of Organic Chemistry*, 38: 3639-3641.

- Lawrence, K.T., Liu, Z.H., Herbert, T.D., 2006. Evolution of the eastern tropical Pacific through Plio-Pleistocene glaciation. *Science*, 312: 79-83.
- Lamy, F., Kaiser, J., Ninnemann, U., Hebbeln, D., Arz, H. W., Stoner, J., 2003. Antarctic timing of surface water changes off Chile and Patagonian ice sheet response. *Science*, 304: 1959-1962.
- Landry, M.R., Kirshtein, J., Constandinou, J., 1996. Abundances and distributions of picoplankton populations in the equatorial Pacific from 12°N to 12°S, 140°W. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 43: 871-890.
- Laws, E.A., Thompson, P.A., Popp, B.N., Bidigare, R.R., 1998. Sources of inorganic carbon for marine microalgal photosynthesis: A reassessment of delta-¹³C data from batch culture studies of *Thalassiosira pseudonana* and *Emiliania huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 43: 136-142.
- Lee, C., Wakeham, S.G., Farrington, J.W., 1983. Variations in the composition of particulate organic matter in a time-series sediment trap. *Marine Chemistry*, 13: 181-194.
- Lee, C., Armstrong, R.A., Cochran, J.K., Engel, A., Fowler, S., Goutx, M., Masqué, P., Miquel, J.-C., Peterson, M.L., Tamburini, C., Wakeham, S.G., 2009a. MedFlux: Investigations of particle flux in the Twilight Zone. *Deep Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 56: 1363-1368.
- Lee, C., Peterson, M.L., Wakeham, S.G., Armstrong, R.A., Cochran, J.K., Miquel, J.-C., Fowler, S.W., Hirschberg, D., Beck, A., Xue, J., 2009b. Particulate organic matter and ballast fluxes measured using time-series and settling velocity sediment traps in the northwestern Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 56: 1420-1436.
- Lee, C., Wakeham, S.G., Hedges, J.I., 2000. Composition and flux of particulate amino acids and chloropigments in equatorial Pacific seawater and sediments. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 47: 1535-1568.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Lehninger principles of biochemistry, 4th Edition. Freeman, W.H. (Ed). New-York, pp. 1119.
- Levitus, S. & Boyer, T., 1994. World ocean atlas, Vol.4. Temperature, NOAA Atlas NESDIS 4. U.S. Government. Printing Office, Washington, DC.
- Li, J.G., Philp, R.P., Pu, F., Allen, J., 1996. Long-chain alkenones in Qinghai Lake sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60: 235-241.
- Lomans, B.P., van der Drift, C., Pol, A., Op den Camp, H.J.M., 2002. Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 575-588.
- Longhurst, A., 1993. Seasonal cooling and blooming in Tropical Oceans. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 40: 2145-2165.
- Lopez, J.F. & Grimalt, J.O., 2004. Phenyl- and cyclopentylimino derivatization for double bond location in unsaturated C₃₇-C₄₀ alkenones by GC-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15: 1161-1172.
- Lopez, J.F., de Oteyza, T.G., Teixidor, P., Grimalt, J.O., 2005. Long chain alkenones in hypersaline and marine coastal microbial mats. *Organic Geochemistry*, 36: 861-872.

- Lopez, J.F. & Grimalt, J.O., 2006. Reassessment of the structural composition of the alkenone distributions in natural environments using an improved method for double bond location based on GC-MS analysis of cyclopropylimines. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17: 710-720.
- Mackenzie, A.S., Brassell, S.C., Eglinton, G., Maxwell, J.R., 1982. Chemical fossils: The geological fate of steroids. *Science*, 217: 491-504.
- Madureira, L.A.S., Conte, M.H., Eglinton, G., 1995. Early diagenesis of lipid biomarker compounds in north Atlantic sediments. *Paleoceanography*, 10: 627-642.
- Mansour, M.P., Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Jackson, A.E., Blackburn, S.I., 1999. Very long chain (C₂₈) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates. *Phytochemistry*, 50: 541-548.
- Mantovani, S.M., Vasconcelos, S.P., de Oliveira, L.G., da Cruz, G.F., Marsaioli, A.J., 2006. High throughput screening for detection of hydrolytic enzymes in Brazilian microorganisms. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50: 245.
- Marchand, D. & Rontani, J.-F., 2001. Characterisation of photo-oxidation and autoxidation products of phytoplanktonic monounsaturated fatty acids in marine particulate matter and recent sediments. *Organic Geochemistry*, 32: 287-304.
- Marchand, D. & Rontani, J.-F., 2003. Visible light-induced oxidation of lipid components of purple sulphur bacteria: A significant process in microbial mats. *Organic Geochemistry*, 34: 61-79.
- Marchand, D., Marty, J.C., Miquel, J.C., Rontani, J.-F., 2005. Lipids and their oxidation products as biomarkers for carbon cycling in the northwestern Mediterranean Sea: Results from a sediment trap study. *Marine Chemistry*, 95: 129-147.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 795-799.
- Marlowe, I.T., 1984. Lipids as paleoclimatic indicators. Ph.D. Thesis. University Bristol, Angleterre.
- Marlowe, I.T., Green, J. C., Neal, A. C., Brassell, S. C., Eglinton, G., Course, P. A., 1984. Long-chain (C₃₇-C₃₉) alkenones in the Prymnesiophyceae: Distribution of alkenones and other lipids and their taxonomic significance. *British Phycological Journal*, 19: 203-216.
- Marlowe, I.T., Brassell, S.C., Eglinton, G., Green, J.C., 1990. Long-chain alkenones and alkyl alkenoates and the fossil coccolith record of marine sediments. *Chemical Geology*, 88: 349-375.
- Martrat, B., Grimalt, J. O., Shackleton, N. J., de Abreu, L., Hutterli, M. A., Stocker, T. F., 2007. Four climate cycles of recurring deep and surface water destabilizations on the Iberian margin. *Science*, 317: 502-507.
- Marty, J.-C., 2002. The DYFAMED time-series program (French JGOFS). *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 49: 1963-1964.
- Marty, J.-C., Chiaverini, J., Pizay, M.-D., Avril, B., 2002. Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean sea at the DYFAMED time-series station (1991-1999). *Deep-Sea Research Part I: Tropical Studies in Oceanography*, 49: 1965-1985.

- Masse, G., Belt, S. T., Allard, W. G., Lewis, C. A., Wakeham, S. G., Rowland, S. J., 2004. Occurrence of novel monocyclic alkenes from diatoms in marine particulate matter and sediments. *Organic Geochemistry*, 35: 813-822.
- McCaffrey, M.A., Farrington, J.W., Repeta, D.J., 1990. The organic geochemistry of Peru margin surface sediments. 1: A comparison of the C₃₇ alkenone and historical El-Niño records. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54: 1671-1682.
- McCave, I.N., 1984. Size spectra and aggregation of suspended particles in the ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 31: 329-352.
- McGregor, H.V., Dima, M., Fischer, H.W., Mulitza, S., 2007. Rapid 20th-century increase in coastal upwelling off north west Africa. *Science*, 315: 637-639.
- Mcintyre, A., 1970. *Gephyrocapsa protohuxleyi* sp. n., a possible phyletic link and index fossil for the Pleistocene. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 17: 187-190.
- Merzlyak, M.N. & Hendry, G.A.F., 1994. Free-radical metabolism, pigment degradation and lipid peroxidation in leaves during senescence. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B- Biological Sciences*, 102: 459-471.
- Michaels, B.C., Ruettinger, R.T., Fulco, A.J., 1980. Hydration of 9,10-epoxypalmitic acid by a soluble enzyme from *Bacillus megaterium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 92: 1189-1195.
- Migon, C., Sandroni, V., Marty, J.-C., Gasser, B., Miquel, J.-C., 2002. Transfer of atmospheric matter through the euphotic layer in the northwestern Mediterranean: Seasonal pattern and driving forces. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 49: 2125-2141.
- Milliman, J. D. & Syvitski, J. P. M., 1992. Geomorphic tectonic control of sediment discharge to the ocean: The importance of small mountainous rivers. *Journal of Geology*, 100: 525-544.
- Mills, C.T., Dias, R.F., Graham, D., Mandernack, K.W., 2006. Determination of phospholipid fatty acid structures and stable carbon isotope compositions of deep-sea sediments of the north west Pacific, ODP site 1179. *Marine Chemistry*, 98: 197-209.
- Minnikin, D.E. & Goodfellow, M., 1981. Lipids in the classification of actinomycetes. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 11: 99-109.
- Miquel J.-C., Fowler, S.W., La Rosa, J., Buat-Menard, P., 1994. Dynamics of the downward flux of particles and carbon in the open NW Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 41: 242-261.
- Mix, A.C., 1987. The oxygen isotope record of glaciation. In: North America and adjacent Oceans during the last deglaciation: The geology of North America v.K-3. Ruddiman, W.F. & Wright, H.E. (Eds). Geological Society of America, pp. 111-135.
- Mix, A. C., 2006. Running hot and cold in the eastern equatorial Pacific. *Quaternary Science Reviews*, 25: 1147-1149.
- Mollenhauer, G., Eglinton, T. I., Ohkouchi, N., Schneider, R. R., Müller, P. J., Grootes, P. M., Rullkötter, J., 2003. Asynchronous alkenone and foraminifera records from the Benguela upwelling system. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67: 2157-2171.

- Mollenhauer, G., McManus, J. F., Benthien, A., Müller, P. J., Eglinton, T., 2006. Rapid lateral particle transport in the Argentine Basin: Molecular ^{14}C and $^{230}\text{Th}_{\text{xs}}$ evidence. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53: 1224-1243.
- Morel, A. & Berthon, J.F., 1989. Surface pigments, algal biomass profiles, and potential production of the euphotic layer : Relationships reinvestigated in view of remote sensing applications. *Limnology and Oceanography*, 34: 1545-1562.
- Müller, P.J., Kirst, G., Ruhland, G., von Storch, I., Rosell-Mele, A., 1998. Calibration of the alkenone paleotemperature index U-37(K ') based on core-tops from the eastern South Atlantic and the global ocean (60°N- 60°S). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62: 1757-1772.
- Müller, P.J. & Fischer, G., 2001. A 4-year sediment trap record of alkenones from the filamentous upwelling region off Cape Blanc, NW Africa and a comparison with distributions in underlying sediments. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 48: 1877-1903.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Naghibi, F., Tabatabai-Yazdi, M., Sahebgharani, M., Noori-Dalooi, M.R., 2002. Microbial transformation of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Sciences*, 13: 103-106.
- Nickon, A. & Bagli, J.F., 1961. Reactivity and geochemistry in allylic systems. I: Stereochemistry of photosensitized oxygenation of monoolefins. *Journal of the American Chemical Society*, 83: 1498-1508.
- Niehaus, W.G., 1974. Thiol-catalyzed *cis/trans* isomerization of oleic acid. *Bioorganic Chemistry*, 3: 302-310.
- Nishiuchi, Y., Baba, T., Hotta, H.H., Yano, I., 1999. Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica* and *N. nova*. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 111-122.
- Nishiuchi, Y., Baba, T., Yano, I., 2000. Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia* and *Dietzia*. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 1-9.
- O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1982. Lipids in the classification of *Nocardioidea*: Reclassification of *Arthrobacter simplex* (Jensen) Lochhead in the genus *Nocardioidea* (Prauser) emend. O'Donnell et al. as *Nocardioidea simplex* comb. nov. *Archives of Microbiology*, 133: 323-329.
- Ohkouchi, N., Kawamura, K., Kawahata, H., Okada, H., 1999. Depth ranges of alkenone production in the central Pacific Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 13: 695-704.
- Ohkouchi, N., Eglinton, T. I., Keigwin, L. D., Hayes, J. M., 2002. Spatial and temporal offsets between proxy records in a sediment drift. *Science*, 298: 1224-1227.
- Okada, H. & Honjo, S., 1973. The distribution of oceanic coccolithophorids in the Pacific. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 26: 355-374.
- Okada, H. & McIntyre, A., 1979. Seasonal distribution of modern coccolithophores in the western north Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 54: 319-328.

- Olausson, E., 1965. Evidence of climatic changes in deep-sea cores with remarks on isotopic paleotemperature analysis. *Progress in Oceanography*, 3: 221-252.
- Olausson, E., 1967. Climatological, geoeconomical and paleoceanographical aspects of carbonate deposition. *Progress in Oceanography*, 4: 245-265.
- Owen, R.W., Mason, A.N., Bilton, R.F., 1983. The degradation of cholesterol by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under aerobic conditions. *Journal of Lipid Research*, 24: 1500-1511.
- Pagani, M., Arthur, M.A., Freeman, K.H., 1999. Miocene evolution of atmospheric carbon dioxide. *Paleoceanography*, 14: 273-292.
- Pagani, M., Freeman, K.H., Ohkouchi, N., Caldeira, K., 2002. Comparison of water column [CO₂aq] with sedimentary alkenone-based estimates: A test of the alkenone-CO₂ proxy. *Paleoceanography*, 17, doi:10.1029/2002PA000756.
- Park, S.C., Baik, K.S., Kim, M.S., Chun, J., Seong, C.N., 2008. *Nocardioides dokdonensis* sp. nov., an actinomycete isolated from sand sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 2619-2623.
- Parker, J.H., Smith, G.A., Fredrikson, H.L., Vestal, J.R., White, D.C., 1982. Sensitive assay based on hydroxyl fatty acids from lipopolysaccharide lipid A, for Gram-negative bacteria in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 1170-1177.
- Parkes, R.J. & Taylor, J., 1983. The relationships between fatty acid distributions and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences*, 16: 173-189.
- Pelejero, C. & Grimalt, J.O., 1997. The correlation between the $U_{37}^{K'}$ index and sea surface temperatures in the warm boundary: The south China Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61: 4789-4797.
- Peltzer, E.T. & Gagosian, R.B., 1989. Organic geochemistry of aerosols over the Pacific Ocean. *Chemical Oceanography*, 10: 281-338.
- Perry, G.J., Volkman, J.K., Johns, R.B., Bavor, H.J. Jr., 1979. Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 43: 1715-1725.
- Peters, K.E. & Moldowan, J.M., 1993. The biomarker guide: Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Prentice-Hall, 352 pp.
- Platen, H. & Schink, B., 1989. Anaerobic degradation of acetone and higher ketones via carboxylation by newly isolated denitrifying bacteria. *Journal of General Microbiology*, 135: 883-891.
- Pokorny, J., 1987. Major factors affecting the autoxydation of lipids. In: Autoxydation of unsaturated lipids. Chan, H.W.S. (Ed). Academic Press, London, pp. 141-206.
- Popp, B.N., Kenig, F., Wakeham, S.G., Laws, E.A., Bidigare, R.R., 1998a. Does growth rate affect ketone unsaturation and intracellular carbon isotopic variability in *Emiliania huxleyi*. *Paleoceanography*, 13: 35-41.
- Popp, B.N., Laws, E. A., Bidigare, R. R., Dore, J. E., Hanson, K. L., Wakeham, S. G., 1998b. Effect of phytoplankton cell geometry on carbon isotopic fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62: 69-77.

- Popp, B.N., Prahl, F.G., Wallsgrove, R.J., Tanimoto, J., 2006. Seasonal patterns of alkenone production in the subtropical oligotrophic north Pacific. *Paleoceanography*, 21, doi:10.1029/2005PA001165.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30: 277-290.
- Poynter, J.G., Farrimond, P., Brassell, S.C., Eglinton, G., 1989. Molecular stratigraphic study of sediments from holes 658A et 660A, leg 108. *Proceedings of the Ocean Drilling Program Scientific Result*, 108: 387-394.
- Prahl, F.G. & Wakeham, S.G., 1987. Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone compositions for paleotemperature assessment. *Nature*, 330: 367-369.
- Prahl, F.G., Muehlhausen, L.A., Zahnle, D.L., 1988. Further evaluation of long-chain alkenones as indicators of paleoceanographic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52: 2303-2310.
- Prahl, F.G., Delange, G.J., Lyle, M., Sparrow, M.A., 1989a. Post depositional stability of long chain alkenones under contrasting redox conditions. *Nature*, 341: 434-437.
- Prahl, F. G., Muehlhausen, L. A., Lyle, M., 1989b. An organic geochemical assessment of oceanographic conditions at MANOP Site C over the past 26,000 years. *Paleoceanography*, 4, 495-510.
- Prahl, F.G., Collier, R.B., Dymond, J., Lyle, M., Sparrow, M.A., 1993. A biomarker perspective on prymnesiophyte productivity in the northeast Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 40: 2061-2076.
- Prahl, F.G., Pisias, N., Sparrow, M.A., Sabin, A., 1995. Assessment of sea surface temperature at 42°N in the California Current over the last 30,000 Years. *Paleoceanography*, 10: 763-773.
- Prahl, F.G., Dymond, J., Sparrow, M.A., 2000a. Annual biomarker record for export production in the central Arabian Sea. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 47:1581-1604.
- Prahl, F. G., Herbert, T., Brassell, S. C., Ohkouchi, N., Pagani, M., Repeta, D., Rosell-Melé, A., Sikes, E., 2000b. Status of alkenone paleothermometer calibration: Report from Working Group 3. *Geochemistry, Geophysics and Geosystems*, 1: 1-13.
- Prahl, F.G., Pilskaln, C.H., Sparrow, M.A., 2001. Seasonal record for alkenones in sedimentary particles from the Gulf of Maine. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 48: 515-528.
- Prahl, F.G., Wolfe, G.V., Sparrow, M.A., 2003. Physiological impacts on alkenone paleothermometry. *Paleoceanography*, 18, doi:10.1029/2002PA000803.
- Prahl, F.G., Popp, B.N., Karl, D.M., Sparrow, M.A., 2005. Ecology and biogeochemistry of alkenone production at Station ALOHA. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 52: 699-719.
- Prahl, F.G., Mix, A.C., Sparrow, M.A., 2006a. Alkenone paleothermometry: Biological lessons from marine sediment records off western South America. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70: 101-117.

- Prahl, F.G., Rontani, J.-F., Volkman, J.K., Sparrow, M.A., Royer, I.M., 2006b. Unusual C₃₅ and C₃₆ alkenones in a paleoceanographic benchmark strain of *Emiliana huxleyi*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70: 2856-2867.
- Prahl, F. G. & Popp, B. N., 2007. Biogeochemical assessment of alkenone export depth in the summertime euphotic zone of the Gulf of California. *Extended Abstracts presented at the ACS National Meeting*, 47: 483-487.
- Prahl, F.G., Rontani, J.-F., Zabeti, N., Walinsky, S.E., Sparrow, M.A., 2010. Systematic pattern in $U_{37}^{K'}$: Temperature residuals for surface sediments from high latitude and other oceanographic settings. *Geochimica Cosmochimica et Acta*, 74: 131–143
- Prauser, H., 1976. *Nocardioides*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26: 58-65.
- Prell, W.L., 1985. The stability of low-latitude sea-surface temperature: An evaluation of the CLIMAP reconstruction with emphasis on the positive SST anomalies, Dept. Energy Tech Report TR-025, Washington, DC.
- Pujalte, M.J., Macian, M.C., Arahall, D.R., Garay, E., 2005. *Stappia alba* sp nov., isolated from Mediterranean oysters. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 672-678.
- Rainey, F.A., Klatte, S., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 1995. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 45: 32-36.
- Rajendran, N., Matsuda, O., Urushigawa, Y., 1991. Microbial biomarker fatty acid composition in coastal sediments. *Journal of the Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University* 30: 31-42.
- Ratledge, C., 1978. Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: *Developments in biodegradation of hydrocarbons*. Watkinson, R.J. (ed). Applied Science Publishers, Barking, pp. 1-46.
- Ratledge, C., 1994. Biodegradation of oils, fats and fatty acids. In: *Biochemistry of microbial degradation*. Ratledge, C. (Ed). Kugler Academic Publishers, Dordrecht, pp. 89-141.
- Rau, G.H., Froelich, P.N., Takahashi, T., Des Marais, D.J., 1991. Does sedimentary organic delta ⁻¹³C record variations in quaternary ocean [CO₂(aq)]? *Paleoceanography*, 6: 335-47.
- Rau, G.H., Takahashi, T., Desmarais, D.J., Repeta, D.J., Martin, J.H., 1992. The Relationship between delta-¹³C of organic matter and [CO₂(aq)] in ocean surface water : Data from a jgofs site in the northeast Atlantic Ocean and a model. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56: 1413-1419.
- Ravens, J.A. & Waite, A.M., 2004. The evolution of silicification in diatoms: Inescapable sinking and sinking as escape. *New Phytologist*, 162: 45-61.
- Rawlings, B.J., 1998. Biosynthesis of fatty acids and related metabolites. *Natural Products Reports*, 15: 275-308.
- Rechka, J.A. & Maxwell, J.R., 1988. Characterisation of alkenone temperature indicators in sediments and organisms. *Advances in Organic Geochemistry*, 13: 727-734.

- Reed, R. K. & Schumacher, J. D., 1987. Physical oceanography. In: The Gulf of Alaska: Physical environment and biological resources. Hood, D.W., & Zimmerman, S.T. (Eds). U.S. Government Printing Office, pp. 57-75.
- Riebesell, U., Revill, A.T., Holdsworth, D.G., Volkman, J.K., 2000. The effects of varying CO₂ concentration on lipid composition and carbon isotope fractionation in *Emiliana huxleyi*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64: 4179-4192.
- Robinson, N., Eglinton, G., Brassell, S.C., Cranwell, P.A., 1984. Dinoflagellate origin for sedimentary 4 α -methylsteroids and 5 α (H)-stanols. *Nature*, 308: 439-442.
- Rontani, J.-F. & Giusti, G., 1986. Study of the substrate influence on the free fatty acids production during growths of marine bacteria on different hydrocarbons. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 12: 61-75.
- Rontani, J.-F., Grossi, V., Faure, F., Aubert, C., 1994. "Bound" 3-methylidene-7,11,15-trimethylhexadecan-1,2-diol: A new isoprenoid marker for the photodegradation of chlorophyll-a in seawater. *Organic Geochemistry*, 21: 135-142.
- Rontani, J.-F., Raphel, D., Cuny, P., 1996. Early diagenesis of intact and photooxidized chlorophyll phytyl chain in a recent temperate sediment. *Organic Geochemistry*, 24: 825-832.
- Rontani, J.-F., Cuny, P., Aubert, C., 1997a. Rates and mechanism of light-dependent degradation of sterols in senescing cells of phytoplankton. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 111A: 139-144.
- Rontani, J.-F., Cuny, P., Grossi, V., Beker, B., 1997b. Stability of long-chain alkenones in senescing cells of *Emiliana huxleyi*: Effect of photochemical and aerobic microbial degradation on the alkenone unsaturation ratio $U_{37}^{K'}$. *Organic Geochemistry*, 26: 503-509.
- Rontani, J.-F., Gilewicz, M.J., Michotey, V.D., Zheng, T.L., Bonin, P.C., Bertrand, J.-C., 1997c. Aerobic and anaerobic metabolism of 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one by a denitrifying bacterium isolated from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 636-643.
- Rontani, J.-F., Cuny, P., Grossi, V., 1998. Identification of a "pool" of lipid photoproducts in senescent phytoplanktonic cells. *Organic Geochemistry*, 29: 1215-1225.
- Rontani, J.-F. & Marchand, D., 2000. Photoproducts of phytoplanktonic sterols: A potential source of hydroperoxides in marine sediments? *Organic Geochemistry*, 31: 169-180.
- Rontani, J.-F., 2001. Visible light-dependent degradation of lipidic phytoplanktonic components during senescence: A review. *Phytochemistry*, 58: 187-202.
- Rontani, J.-F., Marchand, D., Volkman, J.K., 2001. NaBH₄ reduction of alkenones to the corresponding alkenols: A useful tool for their characterisation in natural samples. *Organic Geochemistry*, 32: 1329-1341.
- Rontani, J.-F., Koblizek, M., Beker, B., Bonin, P., Kolber, Z., 2003a. On the origin of *cis*-vaccenic photodegradation products in the marine environment. *Lipids*, 38: 1085-1092.
- Rontani, J.-F., Rabourdin, A., Marchand, D., Aubert, C., 2003b. Photochemical oxidation and autoxidation of chlorophyll phytyl side chain in senescent phytoplanktonic cells: Potential

- sources of several acyclic isoprenoid compounds in the marine environment. *Lipids*, 38: 241-254.
- Rontani, J.-F., Beker, B., Volkman, J.K., 2004. Long-chain alkenones and related compounds in the benthic haptophyte *Chrysothila lamellosa* Anand HAP 17. *Phytochemistry*, 65: 117-126.
- Rontani, J.-F. & Aubert, C., 2005. Characterization of isomeric allylic diols resulting from chlorophyll phytyl side-chain photo- and autoxidation by electron ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19: 637-646.
- Rontani, J.-F. & Volkman, J.K., 2005. Lipid characterization of coastal hypersaline cyanobacterial mats from the Camargue (France). *Organic Geochemistry*, 36: 251-272.
- Rontani, J.-F., Bonin, P., Jameson, I., Volkman, J.K., 2005a. Degradation of alkenones and related compounds during oxic and anoxic incubation of the marine haptophyte *Emiliana huxleyi* with bacterial consortia isolated from microbial mats from the Camargue, France. *Organic Geochemistry*, 36: 603-618.
- Rontani, J.-F., Christodoulou S., Koblizek, M., 2005b. GC/MS structural characterization of fatty acids of marine aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Lipids*, 40: 97-108.
- Rontani, J.-F., Bonin, P., Prahl, F.G., Jameson, I.D., Volkman, J.K., 2006a. Experimental and field evidence for thyl radical-induced stereomutation of alkenones and other lipids in sediments and seawater. *Organic Geochemistry*, 37: 1489-1504.
- Rontani, J.-F., Marty, J.C., Miquel, J.C., Volkman, J.K., 2006b. Free radical oxidation (autoxidation) of alkenones and other microalgal lipids in seawater. *Organic Geochemistry*, 37: 354-368.
- Rontani, J.-F., Prahl, F.G., Volkman, J.K., 2006c. Re-examination of the double bond positions in alkenones and derivatives: Biosynthetic implications. *Journal of Phycology*, 42: 800-813.
- Rontani, J.-F., Harji, R., Volkman, J.K., 2007a. Biomarkers derived from heterolytic and homolytic cleavage of allylic hydroperoxides resulting from alkenone autoxidation. *Marine Chemistry*, 107: 230-243.
- Rontani, J.-F., Jameson, I., Christodoulou, S., Volkman, J.K., 2007b. Free radical oxidation (autoxidation) of alkenones and other lipids in cells of *Emiliana huxleyi*. *Phytochemistry*, 68: 913-924.
- Rontani, J.-F., 2008. Photooxidative and autoxidative degradation of lipids components during the senescence of phototrophic organisms. In: *Phytochemistry research progress*. Matsumoto, T. (Ed). Nova Science Publishers, pp. 115-144.
- Rontani, J.-F. & Aubert, C., 2008. Hydrogen and trimethylsilyl transfers during EI mass spectral fragmentations of hydroxycarboxylic and oxocarboxylic acid trimethylsilyl derivatives. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 19: 66-75.
- Rontani, J.-F., Harji, R., Guasco, S., Prahl, F. G., Volkman, J. K., Bhosle, N. B., Bonin, P., 2008. Degradation of alkenones by aerobic heterotrophic bacteria: Selective or not? *Organic Geochemistry*, 39: 34-51.
- Rontani, J.-F. & Wakeham, S.G., 2008. Alteration of alkenone unsaturation ratio with depth in the Black Sea: Potential roles of stereomutation and aerobic biodegradation. *Organic Geochemistry*, 39: 1259-1268.

- Rontani, J-F., Zabeti, N., Aubert, C., 2009a. Double bond migration to methyldiene positions during electron ionization mass spectrometry of branched monounsaturated fatty acid derivatives. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 20: 1997-2005.
- Rontani, J-F., Zabeti, N., Wakeham, S.G., 2009b. The fate of marine lipids: Biotic vs. abiotic degradation of particulate sterols and alkenones in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 113: 9-18.
- Rosell-Melé, A., Carter, J., Eglinton, G., 1994. Distributions of long-chain alkenones and alkyl alkenoates in marine surface sediments from the north east Atlantic. *Organic Geochemistry*, 22: 501-509.
- Rosell-Melé, A., Carter, J.F., Parry, A.T., Eglinton, G., 1995a. Determination of the $U_{37}^{K'}$ index in geological samples. *Analytical Chemistry*, 67: 1283-1289.
- Rosell-Melé, A., Eglinton, G., Pflaumann, U., Sarnthein, M., 1995b. Atlantic core-top calibration of the $U_{37}^{K'}$ index as a sea surface paleotemperature indicator. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59: 3099-3107.
- Rosell-Melé, A., 1998. Interhemispheric appraisal of the value of alkenone indices as temperature and salinity proxies in high latitude locations. *Paleoceanography*, 13: 694-703.
- Rosell-Melé, A., Comes, P., Müller, P.J., Ziveri, P., 2000. Alkenone fluxes and anomalous $U_{37}^{K'}$ values during 1989-1990 in the north east Atlantic (48°N-21°W). *Marine Chemistry*, 71: 251-264.
- Rosell-Melé, A., Bard, E., Emeis, K. C., Grimalt, J. O., Müller, P.J., Schneider, R., Bouloubassi, I., Epstein, B., Fahl, K., Fluegge, A., Freeman, K., Goni, M., Guntner, U., Hartz, D., Hellebust, S., Herbert, T., Ikehara, M., Ishiwatari, R., Kawamura, K., Kenig, F., de Leeuw, J., Lehman, S., Mejanelle, L., Ohkouchi, N., Pancost, R. D., Pelejero, C., Prahl, F., Quinn, J., Rontani, J. - F., Rostek, F., Rullkotter, J., Sachs, J., Blanz, T., Sawada, K., Schutz-Bull, D., Sikes, E., Sonzogni, C., Ternois, Y., Versteegh, G., Volkman, J. K., Wakeham, S., 2001. Precision of the current methods to measure the alkenone proxy $U_{37}^{K'}$ and absolute alkenone abundance in sediments: Results of an interlaboratory comparison study. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 2, doi:10.1029/2000GC000141.
- Rosell-Melé, A., Jansen, E., Weinelt, M., 2002. Appraisal of a molecular approach to infer variations in surface ocean freshwater inputs into the north Atlantic during the last glacial. *Global and Planetary Change*, 34: 143-152.
- Rostek, F., Bard, E., Beaufort, L., Sonzogni, C., Ganssen, G., 1997. Sea surface temperature and productivity records for the past 240 kyr in the Arabian Sea. *Deep-Sea Research Part II- Topical Studies in Oceanography*, 44: 1461-1480.
- Rostek, F., Ruhland, G., Bassinot, F. C., Müller, P. J., Labeyrie, L. D., Lancelot, Y., Bard, E., 1993. Reconstructing sea surface temperature and salinity using delta- ^{18}O and alkenone records. *Nature*, 364: 319-321.
- Rowland, S.J., Allard, W. G., Belta, S. T., Massae, G., Robert, J. M., Blackburn, S., Frampton, D., Revill, A. T., Volkman, J. K., 2001a. Factors influencing the distributions of polyunsaturated terpenoids in the diatom, *Rhizosolenia setigera*. *Phytochemistry*, 58: 717-728.

- Rowland, S.J., Belt, S. T., Wraige, E. J., Masse, G., Roussakis, C., Robert, J. M., 2001b. Effects of temperature on polyunsaturation in cytostatic lipids of *Haslea ostrearia*. *Phytochemistry*, 56: 597-602.
- Ruehlemann, C., Mulitza, S., Mueller, P.J., Wefer, G., Zahn, R., 1999. Warming of the tropical Atlantic Ocean and slowdown of thermohaline circulation during the last deglaciation. *Nature*, 402: 511-514.
- Ruehlemann, C. & Butzin, M., 2006. Alkenone temperature anomalies in the Brazil-Malvinas Confluence area caused by lateral advection of suspended particulate material. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 7, doi:10.1029/2006GC001251.
- Sachs, J., Schneider, R., Eglinton, T.I., Freeman, K.H., Ganssen, G., McManus, J.F., Oppo, D.L., 2000. Alkenone as paleoceanographic proxies. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 1, doi:10.1029/2000GC000059.
- Sachs, J.P. & Lehman, S.J., 1999. Subtropical North Atlantic temperatures 60,000 to 30,000 years ago. *Science*, 286: 756-759.
- Sachs, J.P., Pahnke, K., Smittenberg, R., Zhang, Z., 2007. Biomarker indicators of past climate. In: Encyclopedia of Quaternary science. Elias, S. (Ed), Elsevier, Amsterdam, 7 pp.
- Sachse, D., Radke, J., Gleixner, G., 2004. Hydrogen isotope ratios of recent lacustrine sedimentary n-alkanes record modern climate variability. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68: 4877-4889.
- Saitou, N. & Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Saliot, A., Laureillard, J., Scribe, P., Sicre, M.-A., 1991. Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Marine Chemistry*, 36: 233-248.
- Santamaria-del-Angel, E. & Alvarez-Borrego, S., 1994. Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone color scanner imagery. *Journal of Geophysical Research*, 99: 7411-7421.
- Sapp, M., Gerdt, G., Wellinger, M., Wichels, A., 2008. Consuming algal products: Trophic interactions of bacteria and a diatom species determined by RNA stable isotope probing. *Helgoland Marine Research*, 62: 283-287.
- Sauer, P.E., Eglinton, T.I., Hayes, J.M., Schimmelmann, A., Sessions, A.L., 2001. Compound specific D/H ratios of lipid biomarkers from sediments as a proxy for environmental and climatic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65: 213-222.
- Sawada, K., Handa, N., Shiraiwa, Y., Danbara, A., Montani, S., 1996. Long-chain alkenones and alkyl alkenoates in the coastal and pelagic sediments of the northwest North Pacific, with special reference to the reconstruction of *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica* ratios. *Organic Geochemistry*, 24: 751-764.
- Sawada, M., Handa, N., Nakatsuka, T., 1998. Production and transport of long-chain alkenones and alkyl alkenoates in a sea water column in the northwestern Pacific off central Japan. *Marine Chemistry*, 59: 219-234.
- Sawada, K. & Shiraiwa, Y., 2004. Alkenone and alkenoic acid compositions of the membrane fractions of *Emiliania huxleyi*. *Phytochemistry*, 65: 1299-1307.

- Schaich, K.M., 1992. Metals and lipid oxidation : Contemporary issues. *Lipids*, 27: 209-218.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Schefuss, E., Damste, J.S.S., 2002. Distributional variations in marine crenarchaeotal membrane lipids: A new tool for reconstructing ancient sea water temperatures? *Earth and Planetary Science Letters*, 204: 265-274.
- Schouten, S., Hopmans, E. C., Forster, A., van Breugel, Y., Kuypers, M. M. M., Damste, J. S. S., 2003. Extremely high sea surface temperatures at low latitudes during the middle Cretaceous as revealed by archaeal membrane lipids. *Geology*, 31: 1069-1072.
- Schouten, S., Rampen, S. W., Geenevasen, J. A. J., Sinninghe Damste J. S., 2005. Structural identification of steryl alkyl ethers in marine sediments. *Organic Geochemistry*, 36: 1323-1333.
- Schouten, S., Ossebaar, J., Schreiber, K., Kienhuis, M. V. M., Langer, G., Benthien, A., Bijma, J., 2006. The effect of temperature, salinity and growth rate on the stable hydrogen isotopic composition of long chain alkenones produced by *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Biogeosciences*, 3: 113-119.
- Schulz, H.M., Schoner, A., Emeis, K.C., 2000. Long-chain alkenone patterns in the Baltic Sea: An ocean freshwater transition. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64: 469-477.
- Schut, F., Gottschal, J.C., Prins, R.A., 1997. Isolation and characterization of the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *FEMS Microbiology Reviews*, 20: 363-369.
- Seki, O., Kawamura, K., Ikehara, M., Nakatsuka, T., Oba, T., 2004. Variation of alkenone sea surface temperature in the Sea of Okhotsk over the last 85 kyrs. *Organic Geochemistry*, 35: 347-354.
- Seki, O., Kawamura, K., Sakamoto, T., Ikehara, M., Nakatsuka, T., Wakatsuchi, M., 2005. Decreased surface salinity in the Sea of Okhotsk during the last glacial period estimated from alkenones. *Geophysical Research Letters*, 32, doi:10.1029/2004GL022177.
- Shirasaka, N., Nishi, K., Shimizu, S., 1995. Occurrence of a furan fatty acid in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1258: 225-227.
- Shirasaka, N., Nishi, K., Shimizu, S., 1997. Biosynthesis of furan fatty acids (F-acids) by a marine bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1346: 253-260.
- Seo, C.W., Yamada, Y., Takada, N., Okada, H., 1981. Hydration of squalene and oleic acid by *Corynebacterium Sp S-401*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45: 2025-2030.
- Sgoutas, D.S. & Kummerow, F.A., 1969. *Cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acid methyl esters without double bond migration. *Lipids*, 4: 283-287.
- Sheng, G.Y., Cai, K. Q., Yang, X. X., Lu, J. L., Jia, G. D., Peng, P. A., Fu, J. M., 1999. Long-chain alkenones in Hotong Qagan Nur Lake sediments and its paleoclimatic implications. *Chinese Science Bulletin*, 44: 259-263.
- Sheridan, C.C., Lee, C., Wakeham, S.G., Bishop, J.K.B., 2002. Suspended particle organic composition and cycling in surface and midwaters of the equatorial Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 49: 1983-2008.

- Shih, T.W., Lin, T.H., Shealy, Y.F., Hill, D.L., 1997. Nonenzymatic isomerization of 9-cis-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds. *Drug Metabolism and Disposition*, 25: 27-32.
- Shuman, F.R. & Lorenzen, C.J., 1975. Quantitative degradation of chlorophyll by a marine herbivore. *Limnology and Oceanography*, 20: 580-586.
- Sicre, M.-A., Paillasseur, J.L., Marty, J.-C., Saliot, A., 1988. Characterization of seawater samples using chemometric methods applied to biomarker fatty acids. *Organic Geochemistry*, 12: 281-288.
- Sicre, M.A., Ternois, Y., Miquel, J.C., Marty, J.C., 1999. Alkenones in the northwestern Mediterranean sea: Interannual variability and vertical transfer. *Geophysical Research Letters*, 26: 1735-1738.
- Sicre, M.A., Ternois, Y., Paterne, M., Martinez, P., Bertrand, P., 2001. Climatic changes in the upwelling region off Cap Blanc, NW Africa, over the last 70 kyr: A multi-biomarker approach. *Organic Geochemistry*, 32: 981-990.
- Sicre, M.A., Bard, E., Ezat, U., Rostek, F., 2002. Alkenone distributions in the north Atlantic and Nordic sea surface waters. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 3, doi:10.1029/2001GC000159.
- Sicre, M.A., Labeyrie, L., Ezat, U., Duprat, J., Turon, J. L., Schmidt, S., Michel, E., Mazaud, A., 2006. Mid-latitude southern Indian Ocean response to northern hemisphere Heinrich events. *Earth and Planetary Science Letters*, 243: 303-304.
- Sicre, M.A., Jacob, J., Ezat, U., Rousse, S., Kissel, C., Yiou, P., Eiriksson, J., Knudsen, K. L., Jansen, E., Turon, J. L., 2008. Decadal variability of sea surface temperatures off north Iceland over the last 2000 years. *Earth and Planetary Science Letters*, 268: 137-142.
- Sikes, E.L., Farrington, J.W., Keigwin, L.D., 1991. Use of the alkenone unsaturation ratio $U_{37}^{K'}$ to determine past sea surface temperatures: Core-top SST calibrations and methodology considerations. *Earth and Planetary Science Letters*, 104: 36-47.
- Sikes, E.L. & Volkman, J.K., 1993. Calibration of alkenone unsaturation ratios $U_{37}^{K'}$ for paleotemperature estimation in cold polar waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57: 1883-1889.
- Sikes, E.L. & Keigwin, L.D., 1994. Equatorial Atlantic sea surface temperature for the last 30 Kyr: A comparison of $U_{37}^{K'}$, $\delta^{18}\text{O}$ and foraminiferal assemblage temperature estimates. *Paleoceanography*, 9: 31-45.
- Sikes, E.L. & Keigwin, L.D., 1996. A reexamination of northeast Atlantic sea surface temperature and salinity over the last 16 kyr. *Paleoceanography*, 11: 327-342.
- Sikes, E.L., Volkman, J.K., Robertson, L.G., Pichon, J.J., 1997. Alkenones and alkenes in surface waters and sediments of the Southern Ocean: Implications for paleotemperature estimation in polar regions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61: 1495-1505.
- Sikes, E.L., Howard, W.R., Neil, H.L., Volkman, J.K., 2002. Glacial-interglacial sea surface temperature changes across the subtropical front east of New Zealand based on alkenone unsaturation ratios and foraminiferal assemblages. *Paleoceanography*, 17, doi:10.1029/2001PA000640.

- Sikes, E.L. & Sicre, M.A., 2002. Relationship of the tetra-unsaturated C₃₇ alkenone to salinity and temperature: Implications for paleoproxy applications. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 3, doi:10.1029/2002GC000345.
- Sikes, E.L., O'Leary, T., Nodder, S.D., Volkman, J.K., 2005. Alkenone temperature records and biomarker flux at the subtropical front on the chatham rise, SW Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 52: 721-748.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Peletier, H., van der Maarel, M.J.E.C., Gieskes, W.W.C., 1999. A C₂₅ highly branched isoprenoid alkene and C₂₅ and C₂₇ n-polyenes in the marine diatom *Rhizosolenia setigera*. *Organic Geochemistry*, 30: 95-100.
- Sinninghe Damsté, J.S., Muyzer, G., Abbas, B., Rampen, S.W., Massé, G., Allard, W.G., Belt, S.T., Robert, J.-M., Rowland, S.J., Moldowan, J.M., Barbanti, S.M., Fago, F.J., Denisevich, P., Dahl, J., Trindade, L.A.F., Schouten, S., 2004. The rise of the rhizosolenoid diatoms. *Science*, 304: 584-587.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., Kenne, L., 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7554-7557.
- Small, L. F., Knauer, G. A., Tuel, M. D., 1987. The role of sinking fecal pellets in stratified euphotic zones. *Deep-sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 34: 1705-1712.
- Small, F.J. & Ensign, S.A., 1995. Carbon dioxide fixation in the metabolism of propylene and propylene-oxide by *Xanthobacter* Strain Py2. *Journal of Bacteriology*, 177: 6170-6175.
- Smith, L.L., Teng, J.I., Kulig, M.J., Hill, F.L., 1973. Sterol metabolism XXIII. Cholesterol oxidation by radiation-induced processes. *Journal of Organic Chemistry*, 38: 1763-1765.
- Smith, L.L., 1981. The autoxidation of cholesterol. Plenum Press, New-York.
- Soltani, M., Metzger, P., Largeau, C., 2004. Effects of hydrocarbon structure on fatty acid, fatty alcohol, and beta-hydroxy acid composition in the hydrocarbon-degrading bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Lipids*, 39: 491-505.
- Sonzogni, C., Bard, E., Rostek, F., Dollfus, D., Rosell-Melé, A., Eglinton, G., 1997a. Temperature and salinity effects on alkenone ratios measured in surface sediments from the Indian Ocean. *Quaternary Research*, 47: 344-355.
- Sonzogni, C., Bard, E., Rostek, F., Lafont, R., Rosell-Melé, A., Eglinton, G., 1997b. Core-top calibration of the alkenone index vs sea surface temperature in the Indian Ocean. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, 44: 1445-1460.
- Sonzogni, C., Bard, E., Rostek, F., 1998. Tropical sea surface temperatures during the last glacial period: A view based on alkenones in Indian Ocean sediments. *Quaternary Science Reviews*, 17: 1185-1201.
- Spiteller, G., 2005. Furan fatty acids: Occurrence, synthesis and reactions. Are furan fatty acids responsible for the cardioprotective effects of a fish diet? *Lipids*, 40:755-771.
- Stabeno, P. J., Bond, N. A., Hermann, A. J., Kachel, N. B., Mordy, C. W., Overland, J. E., 2004. Meteorology and oceanography of the northern Gulf of Alaska. *Continental Shelf Research*, 24: 859-897.

- Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Masson, D.G., Ward, A.C., Goodfellow, M., Bull, A.T., 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6189-6200.
- Stephani, A.P., Chuang, L.-Y.Y., Todd, H.E., 1970. Relative rates of addition of cyclopropyl radicals to olefin. *Journal of the American Chemical Society*, 92: 4168-4173.
- Strömpl, C., Hold, G.L., Lünsdorf, H., Graham, J., Gallacher, S., Abraham, W.-R., Moore, E.R.B., Timmis, K.N., 2003. *Oceanicaulis alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel stalked bacterium isolated from a culture of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1901–1906.
- Strub, P. T., Allen, J. S., Huyer, A., Smith, R. L., 1987. Large-scale structure of the spring transition in the coastal ocean off western North America. *Journal of Geophysical Research*, 92: 1527-1544.
- Sun, M.Y., Zou, L., Dai, J. H., Ding, H. B., Culp, R. A., Scranton, M. I., 2004. Molecular carbon isotopic fractionation of algal lipids during decomposition in natural oxic and anoxic seawaters. *Organic Geochemistry*, 35: 895-908.
- Sun, Q., Chu, G.Q., Liu, G.X., Li, S., Wang, X.H., 2007. Calibration of alkenone unsaturation index with growth temperature for a lacustrine species, *Chrysotila lamellosa* (Haptophyceae). *Organic Geochemistry*, 38: 1226-1234.
- Suutari, M. & Lasko, S., 1993. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*. *Archives of Microbiology*, 199: 119-123.
- Suwa, K., Kimura, T., Schaap, A.P., 1977. Reactivity of singlet molecular oxygen with cholesterol in a phospholipidic membrane matrix: A model for oxidative damage of membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 75: 785-792.
- Swaving, J. & de Bont, J. A. M., 1998. Microbial transformation of epoxides. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 19-26.
- Tamburini, C., Goutx, M., Guigue, C., Garel, M., Lefèvre, D., Charrière, B., Sempéré, R., Pepa, S., Peterson, M.L., Wakeham, S.G., Lee, C., 2009. Effects of hydrostatic pressure on microbial alteration of sinking fecal pellets. *Deep Sea Research II Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 56: 1533-1546.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tanoue, E. & Handa, N., 1980. Vertical transport of organic materials in the northern North Pacific as determined by sediment trap experiments. Part I. Fatty acid composition. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 36: 231-245
- Taylor, J. & Parkes, R.J., 1983. The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp. and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of General Microbiology*, 129: 3303-3309.
- Taylor, J. & Parkes, R.J., 1985. Identifying different populations of sulphate-reducing bacteria within marine sediments, using fatty acid biomarkers. *Journal of General Microbiology*, 131: 631-642.

- Teece, M.A., Getliff, J.M., Leftley, J.W., Parkes, R.J., Maxwell, J.R., 1998. Microbial degradation of the marine prymnesiophyte *Emiliania huxleyi* under oxic and anoxic conditions as a model for early diagenesis: Long chain alkadienes, alkenones and alkyl alkenoates. *Organic Geochemistry*, 29: 863-880.
- Teece, M.A., Fogel, M.L., Dollhopf, M.E., Nealson, K.H., 1999. Isotopic fractionation associated with biosynthesis of fatty acids by a marine bacterium under oxic and anoxic conditions. *Organic Geochemistry*, 30: 1571-1579.
- Teng, J.I., Kulig, M.J., Smith, L.L., Kan, G., van Lier, J.E., 1973. Sterol metabolism XX: Cholesterol 7-hydroperoxide. *Journal of Organic Chemistry*, 38: 119-123.
- ten Haven, H.L., Baas, M., Kroot, M., de Leeuw, J. W., Schenck, P. A., Ebbing, J., 1987. Late Quaternary Mediterranean sapropels 3. Assessment of source of input and paleotemperature as derived from biological markers. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51: 803-810.
- ten Haven, H.L. & Kroon, D., 1991. Late pleistocene sea surface water temperature variations off oman as revealed by the distribution of long-chain alkenones. *Proceedings of the Ocean Drilling Program*, 117: 445-452.
- Ternois, Y., Sicre, M.A., Boireau, A., Marty, J.C., Miquel, J.C., 1996. Production pattern of alkenones in the Mediterranean Sea. *Geophysical Research Letters*, 23: 3171-3174.
- Ternois, Y., Sicre, M.A., Boireau, A., Conte, M.H., Eglinton, G., 1997. Evaluation of long-chain alkenones as paleo-temperature indicators in the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 44: 271-286.
- Ternois, Y., Sicre, M. A., Boireau, A., Beaufort, L., Miquel, J. C., Jeandel, C., 1998. Hydrocarbons, sterols and alkenones in sinking particles in the Indian Ocean sector of the Southern Ocean. *Organic Geochemistry*, 28: 489-501.
- Ternois, Y., Sicre, M.A., Paterne, M., 2000. Climatic changes along the northwestern African continental margin over the last 30 kyrs. *Geophysical Research Letters*, 27: 133-136.
- Theissen, K.M., Zinniker, D.A., Moldowan, J.M., Dunbar, R.B., Rowe, H.D., 2005. Pronounced occurrence of long-chain alkenones and dinosterol in a 25,000 year lipid molecular fossil record from Lake Titicaca, South America. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69: 623-636.
- Thiel, V., Jenisch, A., Landmann, G., Reimer, A., Michaelis, W., 1997. Unusual distributions of long-chain alkenones and tetrahymanol from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61: 2053-2064.
- Thierstein, H.R., Geitzenauer, K.R., Molfino, B., 1977. Global synchronicity of late Quaternary coccolith datum levels: Validation by oxygen isotopes. *Geology*, 5: 400-404.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal-W-improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Thompson, P.A. & Calvert, S.E., 1995. Carbon isotope fractionation by *Emiliania huxleyi*. *Limnology and Oceanography*, 40: 673-679.

- Thomsen, C., Schulz-Bull, D.E., Petrick, G., Duinker, J.C., 1998. Seasonal variability of the long-chain alkenone flux and the effect on the $U_{37}^{K'}$ index in the Norwegian Sea. *Organic Geochemistry*, 28: 311-323.
- Tocher, D.R., Leaver, M.J., Hodgson, P.A., 1998. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Progress in Lipid Research*, 37: 73-117.
- Urbach, J. & Rando, R.R., 1994. Thiol dependent isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid. *Febs Letters*, 351: 429-432.
- van der Werf, M.J., Overkamp, K.M., de Bont, J.A.M., 1998. Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. *Journal of Bacteriology*, 180: 5052-5057.
- Versteegh, G.J.M., Riegman, R., de Leeuw, J.W., Jansen, J.H.F., 2001. $U_{37}^{K'}$ values for *Isochrysis galbana* as a function of culture temperature, light intensity and nutrient concentrations. *Organic Geochemistry*, 32: 785-794.
- Vestal, J.R. & Perry, J.J., 1971. Effect of substrate on the lipids of the hydrocarbon-utilizing *Mycobacterium vaccae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 17: 445-449.
- Villanueva, J., Flores, J.A., Grimalt, J.O., 2002. A detailed comparison of the $U_{37}^{K'}$ and coccolith records over the past 290 years: Implications to the alkenone paleotemperature method. *Organic Geochemistry*, 33: 897-905.
- Villanueva, J. & Grimalt, J.O., 1996. Pitfalls in the chromatographic determination of the alkenone U_{37}^K index for paleotemperature estimation. *Journal of Chromatography A*, 723: 285-291.
- Villanueva, J. & Grimalt, J.O., 1997. Gas chromatographic tuning of the $U_{37}^{K'}$ paleothermometer. *Analytical Chemistry*, 69: 3329-3332.
- Villanueva, J., Grimalt, J.O., Cortijo, E., Vidal, L., Labeyrie, L., 1998. Assessment of sea surface temperature variations in the central North Atlantic using the alkenone unsaturation index $U_{37}^{K'}$. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62: 2421-2427.
- Volkman, J.K. & Johns, R.B., 1977. The geochemical significance of positional isomers of unsaturated fatty acids from an intertidal zone sediment. *Nature*, 267: 693-694.
- Volkman, J.K., Eglinton, G., Corner, E.D.S., Forsberg, T.E.V., 1980a. Long-chain alkenes and alkenones in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Phytochemistry*, 19: 2619-2622.
- Volkman, J.K., Eglinton, G., Corner, E.D.S., Sargent, J.R., 1980b. Novel unsaturated straight-chain C₃₇-C₃₉ methyl and ethyl ketones in marine sediments and a coccolithophore *Emiliana huxleyi*. In: *Advances in organic geochemistry*. Douglas, A.G. & Maxwell, J.R. (Eds). Pergamon Press, Oxford, pp. 219-227.
- Volkman, J.K., 1986. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Organic Geochemistry*, 9: 83-99.
- Volkman, J.K., Burton, H.R., Everitt, D.A., Allen, D.I., 1988. Pigment and lipid compositions of algal and bacterial communities in Ace Lake, Vestfold Hills, Antarctica. *Hydrobiologia*, 165: 41-57.

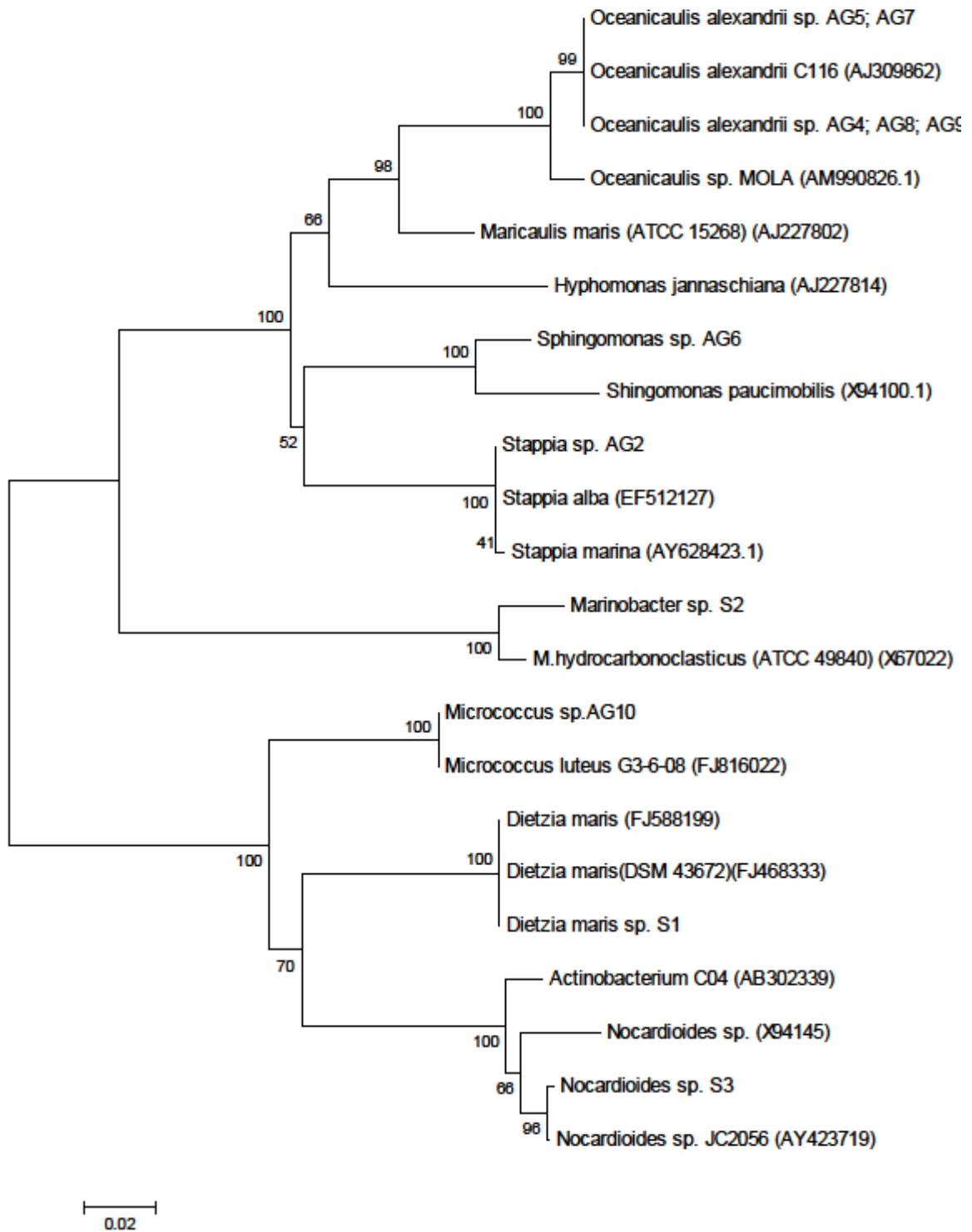
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Dunstan, G.A., 1994. C₂₅ and C₃₀ highly branched isoprenoid alkenes in laboratory cultures of 2 marine diatoms. *Organic Geochemistry*, 21: 407-413.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Sikes, E.L., 1995. Alkenones in *Gephyrocapsa Oceanica* : Implications for studies of paleoclimate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59: 513-520.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Mansour, M.P., Sikes, E.L., Gelin, F., 1998. Microbial biomarkers: A review of recent research developments. *Organic Geochemistry*, 29: 1163-1179.
- Volkman, J.K., 2000. Ecological and environmental factors affecting alkenone distributions in seawater and sediments. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, 1, doi:10.1029/2000GC000061.
- Volkman, J.K., 2003. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 495-506.
- Voss, A., Reinhart, M., Sankarappa, S., Sprecher, H., 1991. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 19995-20000.
- Wakeham, S.G., Farrington, J.W., Gagosian, R.B., 1985. Variability in lipid flux and composition of particulate matter in the Peru upwelling region. *Organic geochemistry*, 6: 203-215.
- Wakeham, S.G. & Canuel, E.A., 1986. Lipid composition of the pelagic crab *Pleuroncodes planipes*, its feces, and sinking particulate matter in the equatorial North Pacific Ocean. *Organic Geochemistry*, 9: 331-343.
- Wakeham, S.G., 1987. Steroid geochemistry in the oxygen minimum zone of the eastern tropical North Pacific Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 51: 3051-3069.
- Wakeham, S.G. & Canuel, E.A., 1988. Organic geochemistry of particulate matter in the eastern tropical North Pacific Ocean: Implications for particle dynamics. *Journal of Marine Research*, 46: 183-213.
- Wakeham, S.G., 1989. Reduction of stenols to stanols in particulate matter at oxic anoxic boundaries in sea water. *Nature*, 342: 787-790.
- Wakeham, S.G. & Lee, C., 1989. Organic geochemistry of particulate matter in the ocean: The role of particles in oceanic sedimentary cycles. *Organic Geochemistry*, 14: 83-96.
- Wakeham, S.G. & Beier, J.A., 1991. Fatty acid and sterol biomarkers as indicators of particulate organic matter source and alteration processes in the water column of the Black Sea. *Deep-Sea Research (suppl. 2)*, 38: S943-S968.
- Wakeham, S.G., Hollander, D.J., Hayes, J.M., 1993. Biogeochemical dynamics of ¹³C in marine POC and related sterols, Oceanography society. The Oceanography Society, Seattle.
- Wakeham, S.G., Hedges, J.I., Lee, C., Peterson, M.L., Hernes, P.J., 1997a. Compositions and transport of lipid biomarkers through the water column and surficial sediments of the equatorial Pacific Ocean. *Deep-Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 44: 2131-2162.

- Wakeham, S.G., Lee, C., Hedges, J.I., Hernes, P.J., Peterson, M.L., 1997b. Molecular indicators of diagenetic status in marine organic matter. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 61: 5363-5369.
- Wakeham, S.G., Peterson, M.L., Hedges, J.I., Lee, C., 2002. Lipid biomarker fluxes in the Arabian Sea: With a comparison to the Equatorial Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 49: 2265-2301.
- Wakeham, S.G., Pease, T.K., Benner, R., 2003. Hydroxy fatty acids in marine dissolved organic matter as indicators of bacterial membrane material. *Organic Geochemistry*, 34: 857-868.
- Wakeham, S.G., Lee, C., Peterson, M.L., Liu, Z., Szlosek, J., Putnam, I.F., J., Xue, J., 2009. Organic biomarkers in the Twilight zone: Time series and settling velocity sediment traps during MedFlux. *Deep Sea Research Part II: Tropical Studies in Oceanography*, 56: 1437-1453.
- Walinsky, S. E., Prah, F. G., Mix, A. C., Finney, B. P., Jaeger, J. M., Rosen, G. P., 2009. Distribution and composition of organic matter in surface sediments of coastal southeast Alaska. *Continental Shelf Research*, 29: 1565-1579.
- Watkinson, R.J., 1978. Developments in biodegradation of hydrocarbons. Applied Science Publishers Ltd, London, pp. 1-199.
- Weaver, P.P.E., Chapman, M. R., Eglinton, G., Zhao, M., Rutledge, D., Read, G., 1999. Combined coccolith, foraminiferal and biomarker reconstruction of paleoceanographic conditions over the past 120 kyr in the northern North Atlantic (59°N, 23°W). *Paleoceanography*, 14: 336-349.
- Weber, C.F. & King, G.M., 2007. Physiological, ecological and phylogenetic characterization of *Stappia*, a marine CO-oxidizing bacterial genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1266-1276.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173:697-703.
- Westbroek, P., Brown, C. W., Vanbleijswijk, J., Brownlee, C., Brummer, G. J., Conte, M., Egge, J., Fernandez, E., Jordan, R., Knappertsbusch, M., Stefels, J., Veldhuis, M., Vanderwal, P., Young, J., 1993. A model system approach to biological climate forcing: The example of *Emiliana huxleyi*. *Global and Planetary Change*, 8: 27-46.
- White, D.C., Stair, J.O., Ringelberg, D.B., 1996. Quantitative comparisons of the *in situ* microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 185-196.
- Winter, A., Jordan, R.W., Roth, P.H., 1994. Biogeography of living coccolithophores in ocean waters. In: Coccolithophores. Winter, A. & Siesser, W.S. (Eds). Cambridge University Press, pp. 161-177.
- Wlodek, L., 2002. Beneficial and harmful effects of thiols. *Polish Journal of Pharmacology*, 54: 215-223.
- Wraige, E.J., Belt, S. T., Lewis, C. A., Cooke, D. A., Robert, J. M., Masse, G., Rowland, S. J., 1997. Variations in structures and distributions of C₂₅ highly branched isoprenoid (HBI) alkenes in cultures of the diatom, *Haslea ostrearia* (Simonsen). *Organic Geochemistry*, 27: 497-505.
- Wraige, E.J., Belt, S.T., Masse, G., Robert, J.M., Rowland, S.J., 1998. Variations in distributions of C₂₅ highly branched isoprenoid (HBI) alkenes in the diatom, *Haslea ostrearia*: Influence of salinity. *Organic Geochemistry*, 28: 855-859.

- Wraige, E.J., Johns, L., Belt, S. T., Masse, G., Robert, J. M., Rowland, S., 1999. Highly branched C₂₅ isoprenoids in axenic cultures of *Haslea ostrearia*. *Phytochemistry*, 51: 69-73.
- Wuchter, C., Schouten, S., Coolen, M.J.L., Damste, J.S.S., 2004. Temperature dependent variation in the distribution of tetraether membrane lipids of marine Crenarchaeota: Implications for TEX₈₆ paleothermometry. *Paleoceanography*, 19, doi:10.1029/2004PA001041.
- Xu, L., Reddy, C. M., Farrington, J. W., Frysinger, G. S., Gaines, R. B., Johnson, C. G., Nelson, R. K., Eglinton, T. I., 2001. Identification of a novel alkenone in Black Sea sediments. *Organic Geochemistry*, 32: 633-645.
- Yamamoto, M., Shiraiwa, Y., Inouye, I., 2000. Physiological responses of lipids in *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica* (Haptophyceae) to growth status and their implications for alkenone paleothermometry. *Organic Geochemistry*, 31: 799-811.
- Yamamoto, M., Shimamoto, A., Fukuhara, T., Naraoka, H., Tanaka, Y., Nishimura, A., 2007. Seasonal and depth variations in molecular and isotopic alkenone composition of sinking particles from the western North Pacific. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers*, 54: 1571-1592.
- Yoch, D.C., 2002. Dimethylsulfoniopropionate: Its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5804-5815.
- Zabeti, N., Bonin, P., Volkman, J.K., Guasco, S., Rontani, J.-F., 2010a. Fatty acid composition of bacterial strains associated with living cells of the haptophyte *Emiliana huxleyi*. *Organic Geochemistry*, 41: 627-636.
- Zabeti, N., Bonin, P., Volkman, J.K., Jameson, I.D., Guasco, S., Rontani, J.-F., 2010b. Potential alteration of $U_{37}^{K'}$ paleothermometer due to selective degradation of alkenones by marine bacteria isolated from the haptophyte *Emiliana huxleyi*. *FEMS Microbiology and Ecology* (accepted for publication).
- Zafiriou, O.C., Joussotdubien, J., Zepp, R.G., Zika, R.G., 1984. Photochemistry of natural waters. *Environmental Science & Technology*, 18: A358-A371.
- Zafiriou, O.C., Gagosian, R.B., Peltzer, E.T., Alford, J.B., 1985. Air-to-sea fluxes of lipids at Enewetak Atoll. *Journal of Geophysical Research*, 90: 2409-2423.
- Zaitsev, G.M., Uolita, J.S., Tsitko, I.V., Lobanok, A.G., Salkinoja-Salonen, M.S., 1995. Utilization of halogenated benzenes, phenols and benzoates by *Rhodococcus opacus* GM-14. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4191-4201.
- Zegouagh, Y., Derenne, S., Largeau, C., Saliot, A., 2000. A geochemical investigation of carboxylic acids released via sequential treatments of two surficial sediments from the Changjiang delta and East China Sea. *Organic Geochemistry*, 31: 375-388.
- Zhao, M., Beveridge, N.A.S., Shackleton, N.J., Sarnthein, M., Eglinton, G., 1995. Molecular stratigraphy of cores off northwest Africa: Sea surface temperature history over the last 80 Ka. *Paleoceanography*, 10: 661-675.

- Zhao, M.X., Eglinton, G., Read, G., Schimmelmann, A., 2000. An alkenone $U_{37}^{K'}$ quasi-annual sea surface temperature record (AD 1440 to 1940) using varved sediments from the Santa Barbara Basin. *Organic Geochemistry*, 31: 903-917.
- Zink, K.G., Leythaeuser, D., Melkonian, M., Schwark, L., 2001. Temperature dependency of long-chain alkenone distributions in recent to fossil limnic sediments and in lake waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65: 253-265.
- Zhou, J.Z., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 316-322.
- Zubkov, M.V., Fuchs, B. M., Archer, S. D., Kiene, R. P., Amann, R., Burkill, P. H., 2001. Linking the composition of bacterioplankton to rapid turnover of dissolved dimethylsulphoniopropionate in an algal bloom in the North Sea. *Environmental Microbiology*, 3: 304-311.

Annexes



Arbre phylogénétique construit à partir des séquences partielles du rDNA 16S (520pb) comparées aux séquences issues de banques de données. Les valeurs de Bootstrap ont été générées à partir de 500 répliquats. Valeur Knuc= 0,02 (2 substitutions pour 100pb).

Double Bond Migration to Methylidene Positions During Electron Ionization Mass Spectrometry of Branched Monounsaturated Fatty Acid Derivatives

Jean-François Rontani,^a Nathalie Zabeti,^a and Claude Aubert^b

^aLaboratoire de Microbiologie de Géochimie et d'Ecologie Marines (UMR-CNRS 6117), Centre d'Océanologie de Marseille (OSU), Marseille, France

^bLaboratoire de Pharmacocinétique et Toxicocinétique (UPRES 3286), Faculté de Pharmacie, Marseille, France

Electron ionization mass spectra of several monounsaturated methyl-branched fatty acid methyl and trimethylsilyl esters were examined. These spectra exhibited some intensive fragment ions, whose formation could be explained after double-bond migration to methylidene position. This preferential migration (substantiated by deuterium labeling) acts significantly in the case of monounsaturated fatty acid methyl and trimethylsilyl esters possessing a methyl branch localized between the penultimate and the C₄ positions (relative to the ester group), whatever the position of the double-bond. Allylic cleavage and β -hydrogen rearrangement of the ionized methylidene group thus formed afforded very interesting fragment ions, which could be particularly useful to determine branching positions of monounsaturated methyl-branched fatty acid methyl and trimethylsilyl esters without additional treatment. (J Am Soc Mass Spectrom 2009, 20, 1997–2005) © 2009 American Society for Mass Spectrometry

Gas chromatography/electron ionization mass spectrometry of methyl (for a review see [1]) and trimethylsilyl [2] esters constitutes a particularly powerful technique for the identification of fatty acids. Unfortunately, the mass spectra of methyl and trimethylsilyl esters of monoenoic fatty acids have no information that helps to locate the position of double bonds. While there have been suggestions that such information can be obtained from close examination of certain minor peaks in the spectrum, the value of such techniques seems doubtful. There is no feature that permits location of the double-bond, because this can migrate to any position when the alkyl chain is ionized in the mass spectrometer. To get around the problem of location of double bonds, it is possible to prepare specific derivatives of unsaturated fatty acids that 'fix' the double-bond. Very many have been described. The more commonly employed are dimethyldisulfide adducts (which have excellent mass spectrometric properties and are prepared in a simple one-pot reaction) [3, 4] and vicinal trimethylsilyl ethers arising from stereospecific OsO₄ oxidation of double bonds [5]. Alternatively, picolinyl esters [6, 7] or DMOX [8] or pyrrolidine [9] derivatives can be utilized to locate

double bonds. In these last cases, the carboxyl group is derivatized with a reagent containing a nitrogen atom. When the molecule is ionized in the mass spectrometer, the nitrogen atom, not the alkyl chain, carries the charge, and double-bond migration is minimized.

Methyl-branched monounsaturated fatty acids have been detected in several bacteria [10–14]; they are also present in some fish [15] and sponge [16, 17]. Careful examination of EI mass spectra of methyl and trimethylsilyl derivatives of these compounds suggested to us that the presence of branching strongly favors the migration of the double-bond to the methylidene position. Such a "specific" migration, which could lead to misinterpretation of mass spectra of these compounds, would be, in contrast, very useful to indicate the position of branching on their alkyl chain without additional treatment. In the present work, we thus: (1) examined EI mass spectra of numerous methyl-branched monounsaturated fatty acids formally identified, and (2) carried out deuterium labeling to try to confirm this assumption.

Experimental

Fatty Acids

C₁₅–C₁₈ iso- and anteiso-methyl-branched monounsaturated fatty acids, 11-methyloctadec-12-enoic and

Address reprint requests to Dr. J.-F. Rontani, Laboratoire de Microbiologie de Géochimie et d'Ecologie Marines (UMR 6117), Centre d'Océanologie de Marseille (OSU), Campus de Luminy – case 901, 13288 Marseille, France. E-mail: jean-francois.rontani@com.univmed.fr

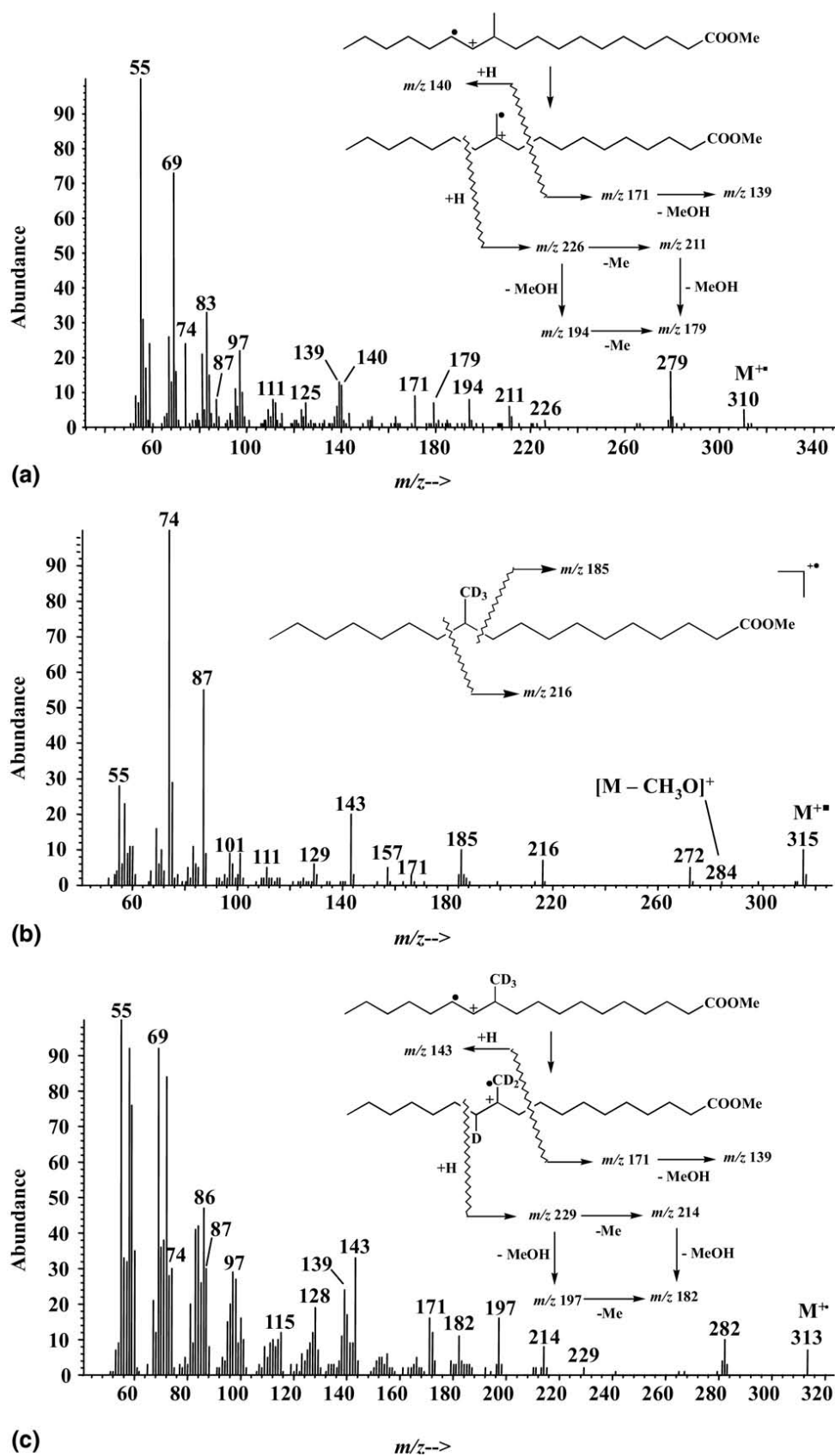


Figure 1. EI mass spectra of (a) 11-methyloctadec-12-enoic, (b) 11(D₃)-methyloctadecanoic, and (c) 11(D₃)-methyloctadec-12-enoic acid methyl esters.

12-methyloctadec-11-enoic acids, were obtained from bacterial lipid extracts [12, 14].

Deuterium Labeling

It was recently demonstrated that the formation of 11-methyloctadec-12-enoic acid in bacteria resulted from the methionine-mediated methylation of *cis*-vaccenic acid [14]. 11(D₃)-methyloctadec-12-enoic acid was thus obtained after growing of the bacterial strain *Oceanicaulis alexandrii* sp. AG4 in a medium supplemented with [methyl-D₃]L-methionine (Aldrich) [14, 18].

Hydrogenation

11(D₃)-methyloctadec-12-enoic acid was hydrogenated (under an atmosphere of H₂) in methanol with Pd/CaCO₃ (5% Pd, 10–20 mg/mg of extract) (Aldrich) as a catalyst for 12 h with magnetic stirring. After hydrogenation, the catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated by rotary evaporation.

Methylation

Lipid extracts were taken up in 2 mL of anhydrous methanolic hydrochloric acid (3N, St. Quentin Fallavier, France, Supelco) and heated at 80 °C for 1 h. After cooling, an excess of water was added and methyl esters were extracted three times with hexane-chloro-

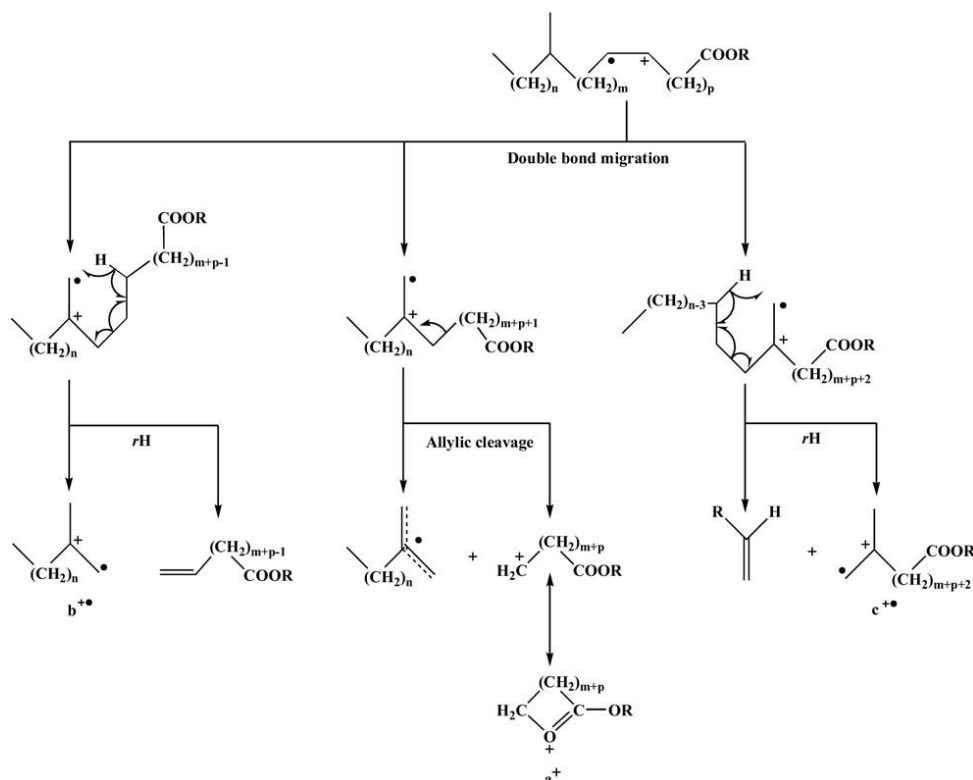
form (4:1, vol/vol), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated using rotary evaporation.

Formation of Pyrrolidide Derivatives

Methyl esters were dissolved in 1 mL pyrrolidine. Then, 0.1 mL of acetic acid was added and the mixture was heated at 100 °C for 1 h. The amides so formed were taken up in dichloromethane and washed with diluted hydrochloric acid (to remove the excess of pyrrolidine) and with water. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to obtain the required pyrrolidide derivatives.

Osmium Tetroxide Oxidation

Lipid extracts and OsO₄ (1:2, wt:wt) were added to a pyridine-dioxane mixture (1:8, vol/vol; 5 mL) and incubated for 1 h at room temperature. Then, 6 mL of Na₂SO₃ suspension (8.5 mL of 16% Na₂SO₃ in water-methanol, 8.5:2.5, vol/vol) was added and the mixture was again incubated for 1.5 h. The resulting mixture was gently acidified (pH 3) with HCl and extracted three times with dichloromethane (5 mL). The combined dichloromethane extracts were subsequently dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated.



Scheme 1. Proposed formation pathways of ions a⁺, b⁺ and c⁺ involving ionized double-bond migration to methylenide position and subsequent allylic cleavage and -hydrogen rearrangement.

Silylation

Compounds (1 mg) to be silylated were taken up in 300 μ L of a mixture of pyridine and BSTFA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; Supelco) (2:1, vol/vol) and allowed to react at 50 $^{\circ}$ C for 1 h. After evaporation to dryness (to eliminate pyridine), the residue was dissolved in ethyl acetate (2 mL/mg) and BSTFA (0.1 mL) (to avoid desilylation) and analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

Mass Spectrometry

Analyses by gas chromatography/electron impact mass spectrometry were performed with a Hewlett Packard HP 5890 series II plus gas chromatograph connected to a HP 5972 mass spectrometer. The following operative conditions were employed: 30 m \times 0.25 mm (i.d.) capillary column coated with SOLGEL-1 (SGE; film thickness, 0.25 μ m); oven temperature programmed from 60 $^{\circ}$ C to 130 $^{\circ}$ C at 30 $^{\circ}$ C min⁻¹ and then from 130 $^{\circ}$ C to 300 $^{\circ}$ C at 4 $^{\circ}$ C min⁻¹; carrier gas (He) pressure was maintained at 1.04 bar until the end of the temperature program and then programmed from 1.04 bar to 1.5 bar at 0.04 bar min⁻¹; injector (splitless) temperature, 250 $^{\circ}$ C; electron energy, 70 eV; source temperature, 170 $^{\circ}$ C; mass range, 50–700 Th; cycle time, 1.5 s.

Results and Discussion

The double-bond and branching positions of C₁₅–C₁₈ *iso*- and *anteiso*-methyl-branched monounsaturated, 11-methyloctadec-12-enoic and 12-methyloctadec-11-enoic acid methyl and trimethylsilyl derivatives whose EI mass spectral fragmentations are examined in the present work were formally determined from EI mass spectra of their pyrrolidide derivatives. Confirmation of the position of double bonds involved GC-EIMS analyses of bis-trimethylsilyloxy derivatives obtained after OsO₄ oxidation and subsequent silylation. We also extended our conclusions to some EI mass spectra previously described in the literature [13, 16, 19].

EI mass spectrum of 11-methyloctadec-12-enoic acid methyl ester (Figure 1a) exhibits significant fragment ions at *m/z* 139, 140, 171, 179, 194, 211, and 226, whose formation by allylic cleavage and β -hydrogen rearrangement may be well explained after migration of the

[12] double-bond to methylenide position (Scheme 1). Indeed, in this case, allylic cleavage and β -hydrogen rearrangement of the alkylester chain would mainly afford fragments ions *a*⁺ at *m/z* 171 and *b*⁺ at *m/z* 140, respectively; further loss of a neutral methanol molecule by the ion *a*⁺ yielding the fragment ion at *m/z* 139. As previously proposed by Boon et al. [23], the driving force for the formation of ion *a*⁺ could be its stabilization by cyclization with the ester group (Scheme 1). This hypothesis was well supported by the lack of this ion in EI mass spectra of corresponding branched alkenes [23].

Table 1. Characteristic mass spectral fragments of some methyl-branched monounsaturated fatty acid methyl esters

Fatty acid methyl esters	<i>a</i> ⁺ <i>m/z</i> (%) ^a	<i>a</i> CH ₃ OH <i>m/z</i> (%)		<i>a</i> CH ₃ OH – H ₂ O <i>m/z</i> (%)	<i>b</i> ⁺ <i>m/z</i> (%)	<i>c</i> ⁺ <i>m/z</i> (%)	<i>c</i> ⁺ CH ₃ OH <i>m/z</i> (%)	<i>c</i> ⁺ CH ₃ OH CH ₃ <i>m/z</i> (%)	<i>c</i> ⁺ CH ₃ <i>m/z</i> (%)
		CH ₃ OH <i>m/z</i> (%)	<i>m/z</i> (%)						
16-Methylheptadec-9-enoic acid	241 (2)	209 (5)	191 (3)						211 (6)
15-Methylhexadec-9-enoic acid	227 (18)	195 (20)	177 (14)						155 (6)
14-Methylpentadec-9-enoic acid	213 (12)	181 (10)							155 (5)
13-Methyltetradec-9-enoic acid	199 (10)	167 (14)			140	226 (3)	194 (8)	179 (7)	155 (5)
11-Methyloctadec-12-enoic acid	213 (11)	181 (8)							155 (5)
7-Methylhexadec-6-enoic acid [22]	171 (9)	139 (11)	51 (3)						155 (5)
7-Methylhexadec-8-enoic acid [16]	115 (21)	125 (43)							141 (4)
7-Methylhexadec-7-enoic acid [15]	115 (21)	125 (43)							141 (4)
6-Methylnonadec-5-enoic acid	115 (21)	125 (43)							141 (4)
4-Methylhexadec-11-enoic acid [13]	115 (21)	125 (43)							141 (4)
4-Methyloct-3-enoic acid [20]	115 (21)	125 (43)							141 (4)
4-Methyloct-2-enoic acid [20]	115 (21)	125 (43)	107 (7)		154 (5)	128 (83)	180 (25)	81 (23)	113 (7)

^aRelative percentage.

The highest intensities of ions a and $(a - \text{C}_3\text{H})$ observed in the case of 7-methyl branched monounsaturated fatty acid methyl esters (where cyclization of the

ion a results in the formation of a well stabilized six-membered ring) (Table 1) are also in good agreement with this hypothesis. On the other side of the

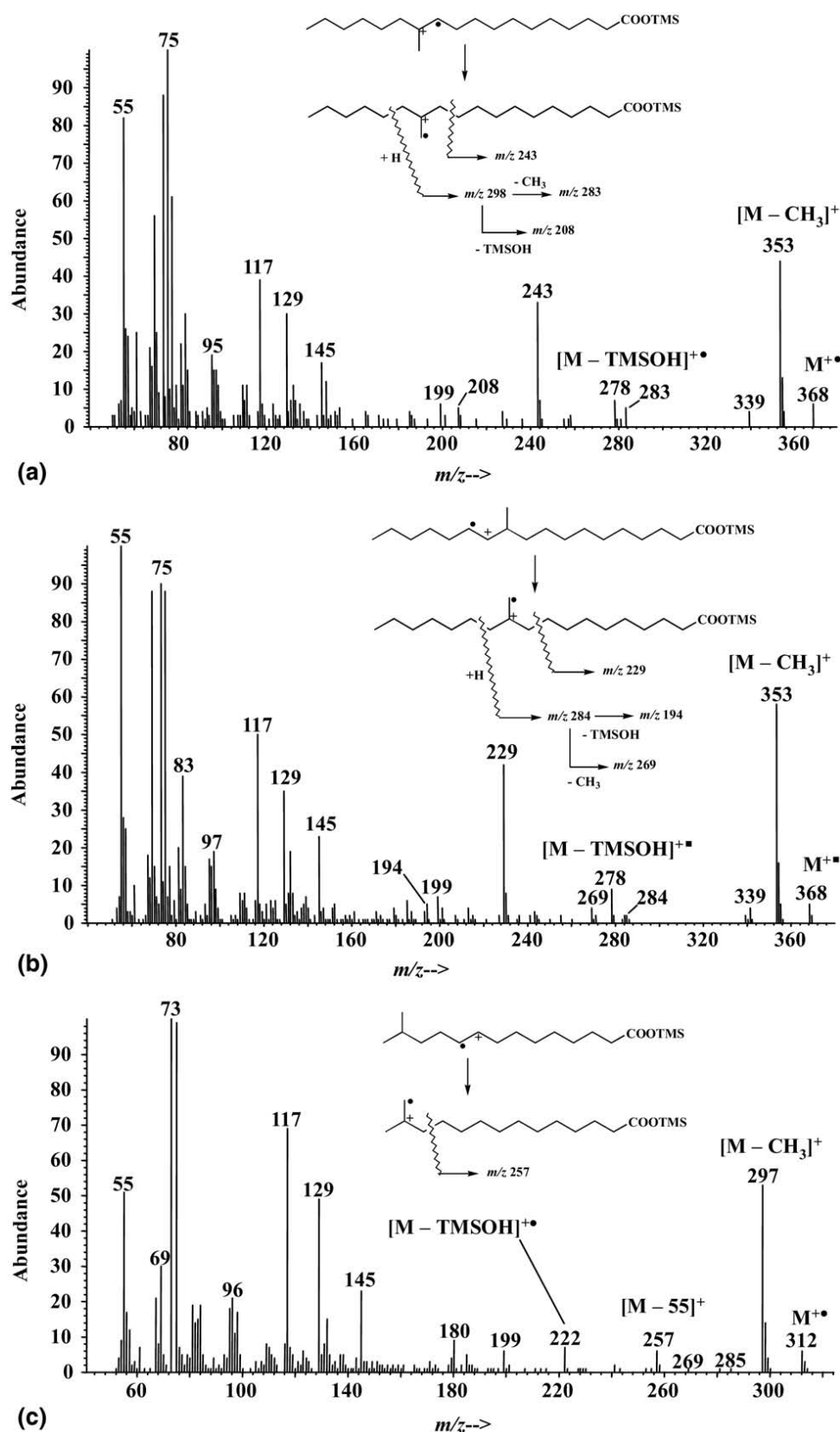


Figure 2. EI mass spectra of (a) 12-methyloctadec-11-enoic, (b) 11-methyloctadec-12-enoic, and (c) 13-methyltetradec-9-enoic acid trimethylsilyl esters.

molecule, β -hydrogen rearrangement of the alkyl chain would result in the formation of a fragment ion c^{\bullet} at m/z 226, which could undergo subsequent losses of methanol

and/or methyl radical affording the ions at m/z 211 ($c^{\bullet} - CH_3$), 194 ($c^{\bullet} - CH_2OH$), and 179 ($c^{\bullet} - CH_2CH_3$) (Figure 1a). The involvement of such double-

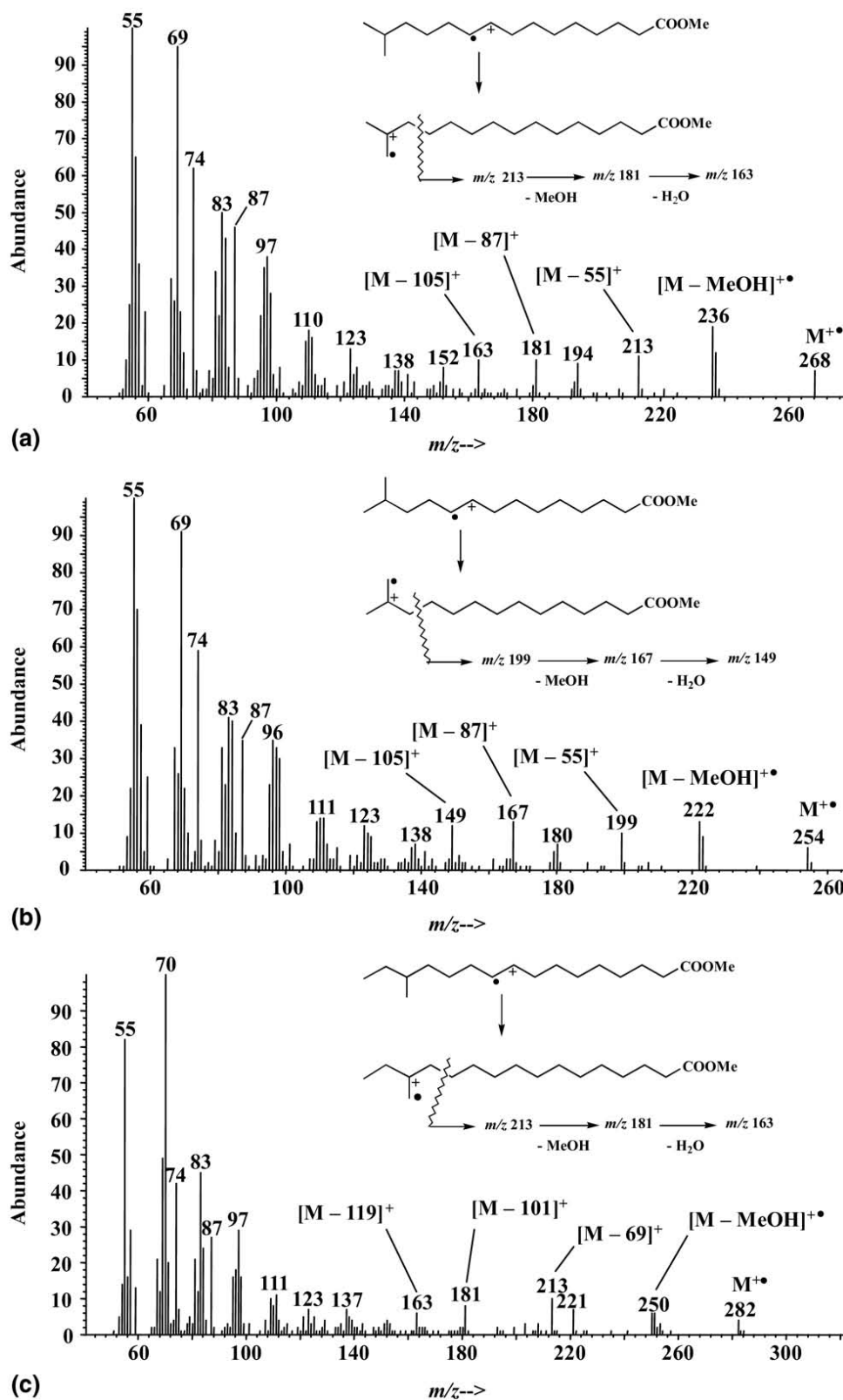


Figure 3. EI mass spectra of (a) 14-methylpentadec-9-enoic, (b) 13-methyltetradec-9-enoic, and (c) 14-methylhexadec-9-enoic acid methyl esters.

bond migration is well supported by the presence of a strong fragment ion at m/z 229 corresponding to ion a in the EI mass spectrum of 11-methyloctadec-12-enoic acid trimethylsilyl ester (Figure 2b).

It was previously established that substitution of alkene hydrogen by electron-donating alkyl groups stabilizes the charge. Indeed, proton affinity (PA) of $\text{CH}_3\text{-CH=CH}_2$ and $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH}_3$ is 7.8 eV, while PA of $(\text{CH}_3)_2\text{C=CH}_2$ and $(\text{CH}_3)_2\text{C=CHCH}_3$ is 8.5 eV [24]. A preferential migration of the ionized double-bond of branched monounsaturated fatty acid derivatives towards the branching seems thus logical. Branching at the double-bond is also well known to be particularly effective for inducing specific dissociation by the β -hydrogen rearrangement with little preceding hydrogen scrambling [24, 25].

To confirm the involvement of this preferential double-bond migration, we produced 11(D_3)-methyloctadec-12-enoic acid from a culture of the bacterial strain *Oceanicaulis alexandrii* sp. AG4, supplemented with [methyl- D_3]L-methionine. The efficiency of the labeling was checked after hydrogenation of this acid and subsequent methylation. The EI mass spectrum of the 11(D_3)-methyloctadecanoic acid methyl ester thus obtained (Figure 1b) confirmed the success of the methyl group labeling. Further examination of the mass spectrum of 11(D_3)-methyloctadec-12-enoic acid methyl ester (Figure 1c) showed that the labeling resulted to the shift of the fragment ions b^+ , c^+ , $(c^+ - \text{CH}_3)$, $(c^+ - \text{CH}_3\text{OH})$, and $(c^+ - \text{CH}_3 - \text{CH}_3\text{OH})$ to m/z 143, 229, 214, 197, and 182, respectively; while the ion a remained unchanged. These results well support the presence of a methylenedioxy double-bond at the position 11 in the ionized molecule.

An additional support of this preferential double-bond migration to the methylenedioxy position was obtained from the EI mass spectrum of 10-methyleneoctadecanoic acid methyl ester, which was previously described in the literature [26]. Indeed, the fragment ions a , $(a - \text{CH}_3\text{OH})$, $(a - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O})$, b^+ , c^+ , $(c^+ - \text{CH}_3)$, $(c^+ - \text{CH}_3\text{OH})$ and $(c^+ - \text{CH}_3 - \text{CH}_3\text{OH})$ (Table correspond to most of the major peaks exhibited by this mass spectrum attesting that in this case the fragmentation of the ionized initial methylenedioxy group takes place without significant double-bond migration.

Similar double-bond migration to methylenedioxy positions allowed us to explain the formation of significant fragment ions in EI mass spectra of several other methyl-branched monounsaturated fatty acid methyl (Figure 3, Table 1) and trimethylsilyl (Figure 2, Table 2) derivatives. Such preferential migration appeared to intervene significantly in the case of fatty acid derivatives where the methyl branch is located between the penultimate and the C_4 positions (relative to the ester group). The particularly high intensity of the peak at m/z 128 corresponding to the ion c^+ in EI mass spectra of 4-methyl-branched monounsaturated fatty acid derivatives (Table 1) results probably from the stabilization of this ion by six-membered cyclization (Scheme 2). In contrast, fragment ions resulting from cleavages of ionized methylenedioxy group (which compete in this case with the strongly favored β - and γ -cleavages of the ester group) appeared to be very weak in EI mass spectra of 3- and 2-methyl-branched monounsaturated fatty acid derivatives [17, 20, 21, 27, 28].

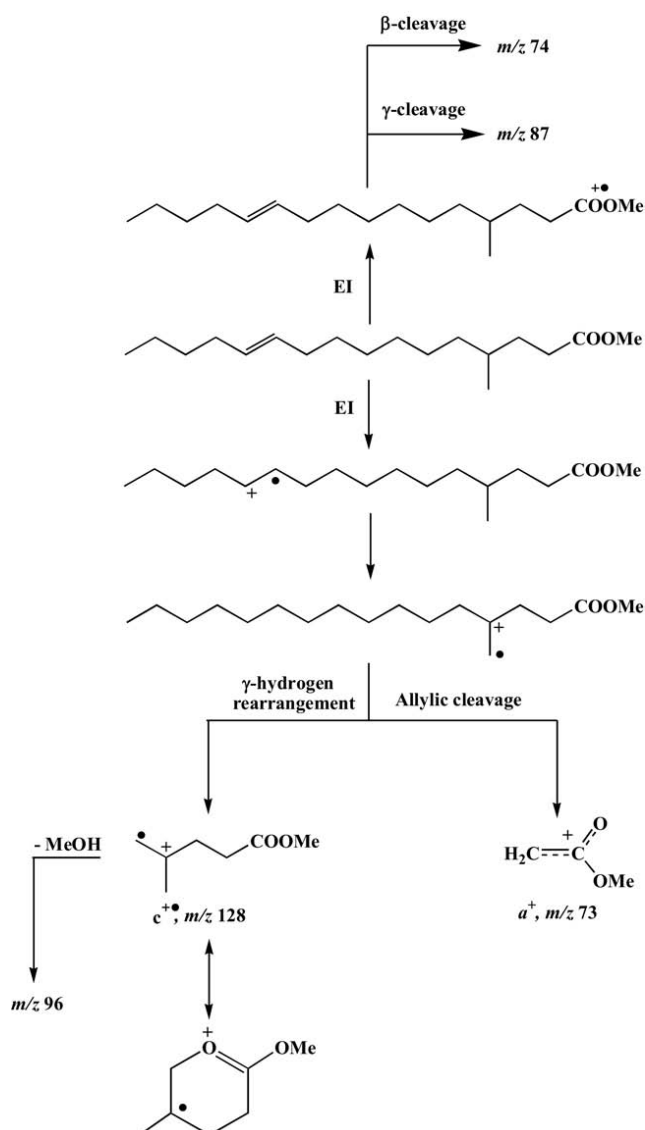
This preferential formation of ionized methylenedioxy group seems to act whatever the double-bond position. However, it may be noted that double-bond migration is relatively limited during EI mass fragmentation of methyl-branched [5] unsaturated fatty acid derivatives (Table 2). Indeed, EI mass spectra of these compounds are strongly dominated by fragment ions resulting from McLafferty rearrangement due to allylic activation by the [5] double-bond of the itinerant β -hydrogen.

Fragment ions at $M^+ 55$ (a^+), $M^+ 87$ ($a^+ - \text{CH}_3$) and $M^+ 105$ ($a^+ - \text{CH}_3\text{OH} - 2\text{H}_2\text{O}$) were proposed as characteristic for monounsaturated iso-methyl-branched fatty acid methyl esters and fragments at $M^+ 69$ (a^+), $M^+ 101$ ($a^+ - \text{CH}_3\text{OH}$) and $M^+ 128$ ($a^+ - \text{CH}_3\text{OH} - 2\text{H}_2\text{O}$) for monoenoic anteiso-branched fatty acid methyl esters [19, 23]. The results obtained in the course of the present work well support the proposal of these authors. However the use of fragment ions arising from EI fragmentation of the ionized methylenedioxy group (formed after preferential double-bond migration) to characterize branched monounsaturated fatty acids is not limited to monounsaturated iso- and anteiso-branched fatty acid methyl esters. It could be extended to all the monounsaturated

Table 2. Characteristic mass spectral fragments of some methyl-branched monounsaturated fatty acid trimethylsilyl esters

Fatty acid trimethylsilyl	a m/z	c^+ m/z (%)	c^+ CH_3OH m/z	c^+ CH_3 m/z
16-Methylheptadec-9-enoic acid	299 (6)			
16-Methylheptadec-11-enoic acid	299 (5)			
14-Methylpentadec-9-enoic acid	257 (6)			
13-Methyltetradec-9-enoic acid	243 (10)			
12-Methyltetradec-9-enoic acid	229 (43)	284 (3)	194 (6)	269 (5)
11-Methyloctadec-12-enoic acid	243 (34)		208 (6)	283 (6)
12-Methyloctadec-11-enoic acid	159 (7)	214 (4)	124	199 (2)

^aRelative percentage.



Scheme 2. Proposed fragmentation pathways of 4-methylhexadec-11-enoic acid methyl ester.

fatty acid methyl and trimethylsilyl derivatives possessing a methyl branch localized between the penultimate and the C₄ positions. Owing to the involvement of this double-bond migration process, differentiation among monounsaturated fatty acid isomers that possess the methyl-branch at the same location but have double-bond at different places is not possible without additional treatments.

Conclusions

While the double-bond of monounsaturated linear fatty acid methyl and trimethylsilyl esters migrate to any position when the alkyl chain is ionized in the mass spectrometer, this is not the case during the ionization of monounsaturated methyl-branched fatty acid methyl and trimethylsilyl esters. Indeed, in this case, migration of the ionized double-bond appeared to be strongly

favoured to methyldiene position, which undergoes subsequent allylic cleavage and γ -hydrogen rearrangement. The involvement of such a preferential migration was confirmed by deuterium labeling and examination of EI mass spectra of several monounsaturated methyl-branched fatty acids derivatives. The fragment ions resulting from the fragmentation of the ionized methyldiene group thus formed will be very useful to characterize branching positions of monounsaturated fatty acid methyl and trimethylsilyl derivatives possessing a methyl branch localized between the penultimate and the C₄ positions, without additional treatment. Due to the involvement of the proposed specific double-bond migration, great care should be taken during the interpretation of EI mass spectra of methyl-branched monounsaturated fatty acid methyl and trimethylsilyl derivatives.

Acknowledgments

The authors acknowledge support of this work by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université de la Méditerranée. Thanks are due to Dr. V. Grossi for the gift of the mass spectra of 6-methylnonadec-5-enoic acid methyl and trimethylsilyl esters. The authors acknowledge two anonymous reviewers for their useful and constructive comments.

References

- Christie, W. W. *Gas chromatography of lipids—a practical guide*; The oily Press: Dundee, 1989; p. 307.
- Pierce, A. E. *Silylation of organic compounds*; Pierce Chemical Co.: Rockford, 1982; p. 487.
- Francis, G. W. Alkylthiolation for the determination of double-bond position in unsaturated fatty acid esters. *Chem. Phys. Lipids* **1981**, *29*, 369–374.
- Scribe, P.; Pepe, C.; Baroux, A.; Fuche, C.; Dagaut, J.; Saliot, A. Détermination de la position de l'insaturation des mono-ènes par chromatographie en phase gazeuse capillaire – spectrométrie de masse des dérivés diméthyl-disulfures: application à l'analyse d'un mélange complexe d'alcènes. *Analisis* **1990**, *18*, 284–288.
- McCloskey, J. A.; McClelland, M. J. Mass spectra of O-isopropylidene derivatives of unsaturated fatty esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5090–5093.
- Christie, W. W. Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **1998**, *33*, 343–353.
- Hamilton, J. T. G.; Christie, W. W. Mechanisms for ion formation during the electron impact-mass spectrometry of picolinyl ester and 4,4-dimethylloxazoline derivatives of fatty acids. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *105*, 93–104.
- Zhang, J. Y.; Yu, Q. T.; Liu, B. N.; Huang, Z. H. Chemical modification in mass spectrometry IV. 2-Alkenyl-4,4-dimethylloxazolines as derivatives for double bond location of long-chain olefinic acids. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *15*, 33–44.
- Vetter, W.; Walther, W.; Vecchi, M. Pyrrolidides as derivatives for structural analysis of aliphatic and alicyclic fatty acids by mass spectrometry. *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 1599–1605.
- Shirasaka, N.; Nishi, K.; Shimizu, S. Biosynthesis of furan fatty acids (F-acids) by a marine bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1346*, 253–260.
- Kerger, B. D.; Nichols, P. D.; Antworth, C. P.; Sand, W.; Bock, E.; Cox, J. C.; Langworthy, T. A.; White, D. C. Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacillus* spp.: methoxy, cyclopropyl, γ -hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1986**, *38*, 67–77.
- Rontani, J.-F.; Christodoulou, S.; Kobizek, M. GC-MS structural characterization of fatty acids from marine aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Lipids* **2005**, *40*, 97–108.
- Grossi, V.; Cravo-Laureau, C.; Méou, A.; Raphel, D.; Garzino, F.; Hirschler-Réa, A. Anaerobic 1-alkene metabolism by the alkane and alkene-degrading sulphate reducer *Sulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7882–7890.
- Zabeti, N.; Bonin, P.; Volkman, J. K.; Guasco, S.; Rontani, J.-F. Fatty acid composition of bacteria associated with living cells of *Emiliania huxleyi*. *Lipids*, unpublished (submitted).

15. Dur, L. A. D. Isolation and characterization of branched chain fatty acids (other than those derived from phytol) in cod liver oil. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1983**, DOI: 10.1111/j. 1365-2621.1983.tb00261.
16. Carballeira, N. M.; Maldonado, M. E. 7-Methyl-8-hexadecenoic acid: a novel fatty acid from the marine sponge *Desmapsama anchorata*. *Lipids* **1988**, *23*, 690–693.
17. Imbs, A. B.; Rodkina, S. A. Isolation of 2-methyl branched unsaturated very long fatty acids from marine sponge *Halichondria panacea* and identification of them by GC-MS and NMR. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *129*, 173–181.
18. Couderc, F. Gas chromatography/tandem mass spectrometry as an analytical tool for the identification of fatty acids. *Lipids* **1995**, *30*, 691–699.
19. Suutari, M.; Laasko, S. Signature GLC-MS ions in identification of ω -5- and ω -6-unsaturated *iso*- and *anteiso*-branched fatty acids. *J. Microbiol. Methods* **1993**, *17*, 39–48.
20. Wilkes, H.; Rabus, R.; Fisher, T.; Armstroff, A.; Behrends, A.; Widdel, F. Anaerobic degradation of *n*-hexane in a denitrifying bacterium: Further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via C-skeleton rearrangement. *Arch. Microbiol.* **2002**, *177*, 235–243.
21. Rontani, J.-F. Electron ionization mass spectrometric determination of double bond position in monounsaturated ω -5- and ω -6-isomeric isoprenoid acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 961–967.
22. Christie, W. W. The lipid library. <http://www.lipidlibrary.co.uk/ms/masspec.html>.
23. Boon, J. J.; de Graaf, B.; Schuyl, P. J. W.; de Lange, F.; de Leeuw, J. W. The mass spectrometry of *iso*- and *anteiso*-monoenoic fatty acids. *Lipids* **1977**, *12*, 717–721.
24. McLafferty, F. W.; Turecek, F. *Interpretation of mass spectra*, 4th ed.; University Science Books: Sausalito, CA, 1993; p. 231.
25. Kingston, D. G.; Bursey, J. T.; Bursey, M. M. Intramolecular hydrogen transfer in mass spectra. II. The McLafferty rearrangement and related reactions. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 215–242.
26. Yagüe, G.; Segovia, M.; Valero-Guillén, P. L. Phospholipid composition of several clinically relevant *Corynebacterium* species as determined by mass spectrometry: an unusual fatty acyl moiety is present in inositol-containing phospholipids of *Corynebacterium urealyticum*. *Microbiol.* **2003**, *149*, 1675–1685.
27. Rontani, J.-F.; Aubert, C. Electron ionization mass spectral fragmentation of C_{19} isoprenoid aldehydes and carboxylic acid methyl and trimethylsilyl esters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 949–956.
28. Zaknun, J.; Elmaleh, D. R.; Guan, J.-G.; Fischman, A. J. Effect of monounsaturations of a branched acid on organ selectivity. *J. Nuclear Med.* **1995**, *36*, 2062–2068.